

Bildgebung von magnetisch markierten Stammzellen in experimentellen Krankheitsmodellen des ZNS mittels zellulärer Magnetresonanztomographie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biophysik

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der
Humboldt-Universität zu Berlin von

Dipl. Biophys. Albrecht Stroh

geboren am 27. Mai 1974 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Hans Jürgen Prömel, in Vertretung

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Thomas Buckhout, PhD

Gutachter:

1. Prof. Dr. Klaus Peter Hofmann
2. Prof. Dr. Claus Zimmer
3. Prof. Dr. Ulrich Dirnagl

Tag der mündlichen Prüfung: 23.5.2006

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	2
ZUSAMMENFASSUNG	4
PRÄAMBEL	5
1 EINLEITUNG	7
1.1 ZELLULÄRE MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE	7
1.2 MORBUS PARKINSON UND STAMMZELLTHERAPIE	9
1.3 CEREBRALE ISCHÄMIE UND STAMMZELLTHERAPIE	12
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	13
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 ZELLINIEN UND METHODEN DER ZELLKULTUR	15
2.2 MAGNETISCHE MARKIERUNG VON ZELLEN	16
2.3 NMR-RELAXOMETRIE UND ATOM-ABSORPTIONS-SPECTROSKOPIE (AAS)	18
2.4 CONFOCALE LASER-SCANNING MIKROSKOPIE	18
2.5 PRÄPARATION DER GELPHANTOME	19
2.6 BESTIMMUNG DER ZELLULÄREN OXIDATIVEN BELASTUNG	20
2.7 6-OHDA-LÄSION DER RATTE	20
2.8 STEREOTAKTISCHE TRANSPLANTATION MAGNETISCH MARKIERTER STAMMZELLEN	21
2.9 AMPHETAMININDUZIERTER ROTATION	21
2.10 BILDGEBUNGSSTUDIE AN EINEM 6-OHDA-MODELL DER RATTE	22
2.11 BILDGEBUNGSSTUDIE AN EINEM MAUSMODELL DER CEREBRALEN ISCHÄMIE	23
2.12 MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE BEI 1,5 UND 7 TESLA	25
2.13 MR-BILDGEBUNG ZUM ZELLULÄREN DETEKTIONSLIMIT BEI 17,6 TESLA	26
2.14 HISTOLOGIE UND IMMUNHISTOCHEMIE	27
3 UNTERSUCHUNGEN ZUR MAGNETISCHEN MARKIERUNG VON ZELLEN IN VITRO DURCH EISENOXIDNANOPARTIKEL	28
3.1 MAGNETISCHE MARKIERUNG VON ZELLPOPULATIONEN MIT EISENOXIDNANOPARTIKELN VSOP ..	29
3.2 EINFLUSS VON LIPOFEKTIONSAGENZIEEN UND INKUBATIONSZEITEN AUF DIE INTRAZELLULÄRE AUFNAHME VON EISENOXIDNANOPARTIKELN	33
3.3 MODELLIERUNG DES ZUSAMMENHANGES DER REDUKTION DER T2-ZEITEN VON DER ERHÖHUNG DER INTRAZELLULÄREN EISENMENGE	36
3.4 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION DES FLUORESCENZMARKIERTEN EISENOXIDNANOPARTIKELS VSOP C200	38
3.5 MAGNETISCHE MARKIERUNG VON ZELLEN ALS VITALITÄTSMARKER IN VITRO UND IN VIVO	39
3.6 VITALITÄTS- UND PROLIFERATIONSASSAYS	42
3.7 UNTERSUCHUNGEN ZUM OXIDATIVEN STRESS IN VITRO	45

3.8	EINFLUSS DER MAGNETISCHEN MARKIERUNG AUF DIE DIFFERENZIERUNGSFÄHIGKEIT EMBRYONALER STAMMZELLEN.....	47
4	DETEKTIONSLIMIT MAGNETISCH MARKIERTER EMBRYONALER STAMMZELLEN IN VITRO UND IN VIVO – MR-TOMOGRAPHIE BEI 1,5 T, 7 T UND 17,6 T	50
4.1	KERNSPINTOMOGRAPHISCHE BILDGEBUNG VSOP-MARKIERTER ZELLEN IN EINER GELMATRIX ...	51
4.2	DETEKTIONSLIMIT VON MAGNETISCH MARKIERTEN EMBRYONALEN STAMMZELLEN BEI 17,6 TESLA IN VIVO	53
4.3	HISTOLOGISCHE KORRELATION UND QUANTIFIZIERUNG	55
4.4	ABHÄNGIGKEIT DES DETEKTIONSLIMITS MAGNETISCH MARKIERTER ZELLEN VON DER FELDSTÄRKE	57
5	TRANSPLANTATION VON MAGNETISCH MARKIERTEN EMBRYONALEN STAMMZELLEN IM PARKINSON MODELL DER RATTE	62
5.1	KERNSPINTOMOGRAPHISCHE STUDIE ÜBER 6 MONATE BEI 7 T IN VIVO	63
5.2	FUNKTIONELLE KORRELATION	66
5.3	HISTOLOGISCHE KORRELATION UND CHARAKTERISIERUNG	67
6	MRT VON SYSTEMISCH INJIZIERTEN VORLÄUFERZELLEN IM SCHLAGANFALLMODELL DER MAUS BEI 7 T IN VIVO	73
6.1	T2-GEWICHTETE BILDGEBUNG.....	74
6.2	T2*-GEWICHTETE MR-BILDGEBUNG	75
6.3	HISTOLOGISCHE KORRELATION	79
6.4	VERGLEICH DER TRANSPLANTATIONSPROTOKOLLE.....	81
7	DISKUSSION.....	82
7.1	ZELLULÄRE MAGNETISCHE MARKIERUNG	82
7.2	KERNSPINTOMOGRAPHISCHE VISUALISIERUNG MAGNETISCH MARKIERTER ZELLEN.....	86
7.3	ZELLULÄRE MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE AN KLEINTIERMODELLEN DES MORBUS PARKINSON SOWIE DER CEREBRALEN ISCHÄMIE.....	87
7.4	AUSBLICK.....	91
	LITERATURVERZEICHNIS	92
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	99
	DANKSAGUNG.....	101
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	103
	PUBLIKATIONEN	104

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Bildgebung magnetisch markierter Stammzellen im ZNS mittels Magnetresonanztomographie. Dazu wurden Stammzellen mit Eisenoxidnanopartikeln (VSOP, very small superparamagnetic iron-oxide particles) *in vitro* effizient und ohne zusätzliche Lipofektionsagenzien magnetisch markiert. Es zeigte sich bei VSOP-Konzentrationen, die eine effiziente magnetische Markierung ermöglichen, keine wesentliche Beeinflussung der Vitalität, Proliferation und Differenzierungsfähigkeit sämtlicher untersuchter Zellpopulationen. Zur Evaluierung der Grenzen der zellulären MR-Bildgebung wurde das Detektionslimit magnetisch markierter embryonaler Stammzellen *in vivo* nach intrastriataler Injektion im Gehirn der Ratte untersucht. Es ließen sich bei einer Feldstärke von 17,6 T weniger als 100 magnetisch markierte Zellen sicher vom Hirnparenchym abgrenzen. Die histologische Korrelation bestätigte den zellulären Ursprung der beobachteten T2*-Hypointensitäten.

In einem Rattenmodell des Morbus Parkinson konnte eine spezifische Detektion der intrastriatal injizierten magnetisch markierten embryonalen Stammzellen über einen Zeitraum von 6 Monaten erreicht werden. Es konnte keine signifikante Migration der Zellen festgestellt werden, jedoch fanden sich große interindividuelle Unterschiede in ihrer räumlichen Verteilung. In der histologische Analyse stellten sich auch sechs Monate nach der Transplantation im Bereich des Stichkanals eisenoxidmarkierte Stammzellen dar, es konnten noch ca. 10 % der transplantierten Zellen nachgewiesen werden.

In einem Mausmodell der cerebralen Ischämie wurde erstmals die Anreicherung *systemisch* injizierter magnetisch markierter mononukleärer Zellen kernspintomographisch erfasst. 24 - 48 h nach der Injektion magnetisch markierter Zellen stellten sich T2*-gewichtete Signalhypointensitäten im Randbereich der Ischämie dar. Insgesamt zeigte sich in dieser Studie die zelluläre Magnetresonanztomographie zu einem nicht-invasiven Nachweis einer geringen Anzahl magnetisch markierter Zellen über einen langen Zeitraum mit hoher Sensitivität in der Lage.

Präambel

Die Stammzelltransplantation stellt einen viel versprechenden Ansatz in der Therapie von sowohl akuten als auch chronisch-degenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) dar. Experimentelle Studien zeigen einen restaurativen Effekt u. a. bei Morbus Parkinson [1, 2, 3], cerebraler Ischämie [4, 5, 6] und chronischer Neuroinflammation [7, 8, 9]. Die Vermittlung des therapeutischen Effekts – Restauration degenerierter neuronaler Strukturen versus Stimulation endogener Reparaturmechanismen – bleibt bislang jedoch umstritten. Eine Evaluierung der verschiedenen Transplantationstechniken und -protokolle und die Übertragung der durchaus erfolgreichen experimentellen Studien auf den Menschen sind bislang nicht gelungen. Klinische Studien zeigten bislang widersprüchliche Ergebnisse und führten lediglich in Einzelfällen zu einer Verbesserung der klinischen Symptomatik [10, 11]. Dies ist auch im Fehlen einer Methodik begründet, die eine spezifische und räumlich hochaufgelöste Sichtbarmachung der transplantierten Zellen über einen längeren Zeitraum erlaubt. Die vorliegende Arbeit versucht eine Methodik zu etablieren, magnetisch markierte Stammzellen im lebenden ZNS mittels Magnetresonanztomographie zu visualisieren. Es sollte möglich sein, die hohe räumliche Auflösung der Kernspintomographie mit der Spezifität nuklearmedizinischer Methodik zu verbinden.

Exemplarisch wurden hier eine chronische neurodegenerativen Erkrankung – Morbus Parkinson – sowie ein akuter Insult – die cerebrale Ischämie – anhand von Kleintiermodellen untersucht.

Das experimentelle Grundkonzept des hier vorgestellten Ansatzes besteht aus zwei charakteristischen Komponenten:

- Die erste Komponente besteht in der extrakorporalen magnetischen Markierung der Stammzellen mittels Inkubation mit Eisenoxidnanopartikeln. Die extrakorporale Markierung ist die Grundvoraussetzung der Spezifität späterer Detektion. Im ersten untersuchten Krankheitsmodell, dem Rattenmodell des Morbus Parkinson, wurde eine intrastriatale stereotaktische Transplantation magnetisch markierter embryonaler Stammzellen durchgeführt, wogegen im zweiten Krankheitsmodell, einem Mausmodell der cerebralen Ischämie, eine intravenöse Injektion magnetisch markierter mononukleärer Zellen erfolgte.

- Die zweite Komponente besteht in der Visualisierung der Stammzellen durch Magnetresonanzbildgebung. Eisenoxidmarkierte Zellen verursachen eine

ausgeprägte Hypodensität in T2*-gewichteter MR-Bildgebung, und sind somit vom umgebenden Hirnparenchym zu diskriminieren. Somit sollten Aussagen über Lokalisation, eventueller Migration und Überleben der transplantierten Zellen über einen längeren Zeitraum möglich sein.

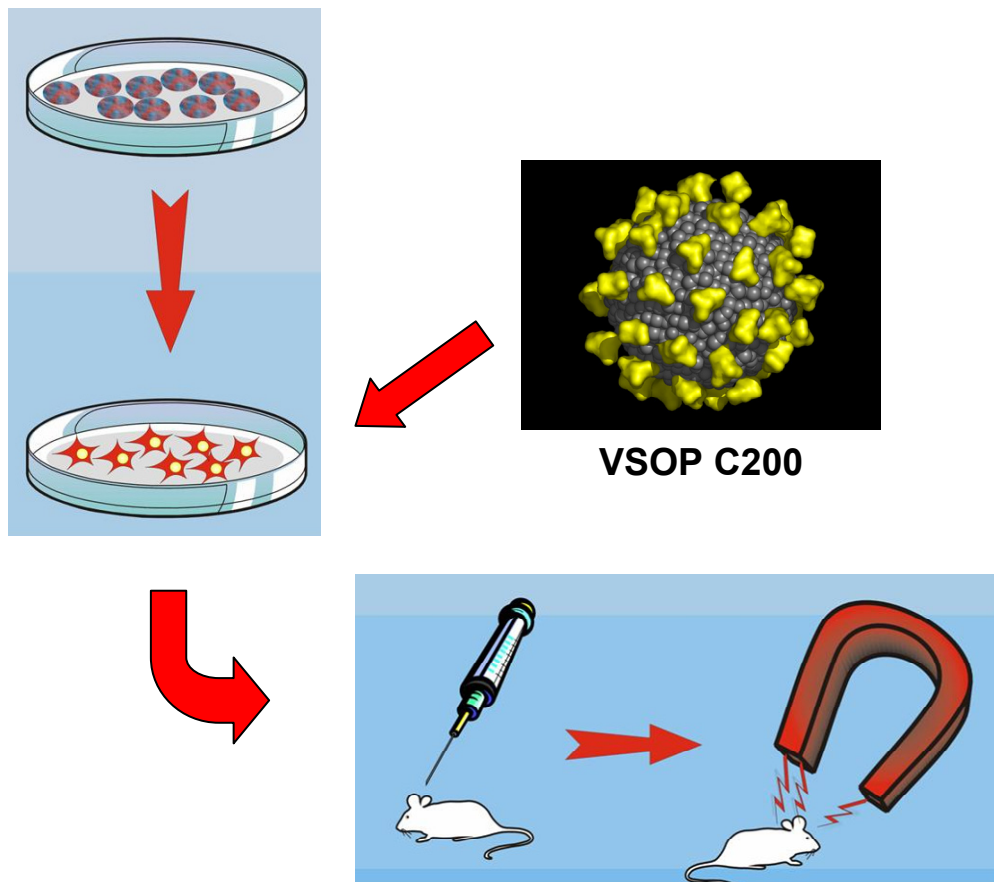


Abbildung 1: Experimentelles Grundkonzept des vorliegenden Ansatzes zellulärer Magnetresonanzbildgebung.

1 Einleitung

1.1 Zelluläre Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie ist eine nicht-invasive Bildgebungsmodalität, deren Bilderzeugung auf dem magnetischen Spin von Atomkernen mit ungeraden Protonenzahlen beruht. Unter diesen Atomkernen eignen sich Protonen aufgrund ihres hohen gyromagnetischen Verhältnisses und der daraus resultierenden hohen Signalintensität und ihres ubiquitären Vorkommens zur Bildgebung von organischen Strukturen am besten. Die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) ermöglicht sowohl im Menschen als auch im Kleintiermodell eine hohe Ortsauflösung, erfordert jedoch eine effiziente magnetische Markierung um eine ausreichende Spezifität für eine zelluläre bzw. molekulare Bildgebung zu gewährleisten. Nuklearmedizinische Techniken wie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) erlauben im Vergleich zur Magnetresonanztomographie zwar ebenso eine nicht-invasive und hochspezifische Visualisierung, jedoch ist keine ausreichende räumliche Auflösung gegeben [12].

Die maximale räumliche Auflösung in einem kernspintomographischen Bildgebungsexperiment hängt von physikalischen und technischen Faktoren wie der Stärke des statischen Magnetfeldes B_0 , der Gradientenfeldstärke und der Art der Sende- bzw. Empfangsspule ab. Sie liegt im Falle des hier verwendeten 7 T Kleintier-MRT bei unter $50 \mu\text{m}^3$. Bei *in vivo* Experimenten kann diese Auflösung aufgrund des zu kleinen Signal-zu-Rausch Verhältnisses, bedingt durch die Limitationen der Messzeit (maximale Narkosedauer), jedoch nicht realisiert werden. Dabei verhält sich die Signalintensität S_0 proportional zur Protonendichte ρ und stellt somit bei gegebener Feldstärke einen unveränderlichen Gewebeparameter dar. Bei der Bildgebung des ZNS *in vivo* kann somit von maximalen effektiven Auflösungen von $100 \mu\text{m}^3$ bei einer Feldstärke von 7 T ausgegangen werden. Der Bildkontrast im kernspintomographischen Bildgebungsexperiment ist neben der Protonendichte ρ abhängig von der Spin-Gitter-Relaxation (longitudinale Relaxation, T_1) bzw. der Spin-Spin-Relaxation (transversale Relaxation, T_2) der durch einen elektromagnetischen Puls (RF-Puls) angeregten Protonenspins. Die longitudinale Relaxation und die transversale Relaxation können mit Exponentialfunktionen beschrieben werden. Die charakteristischen Zeitkonstanten werden als T_1 -Relaxationszeit (Spin-Gitter-Relaxation) bzw. T_2 -Relaxationszeit (Spin-Spin-Relaxation) bezeichnet und stellen weitere voneinander unabhängige Gewebeparameter dar. Im realen

Bildgebungsexperiment ist jedoch der Zerfall der Phasenkohärenz der Protonenspins nicht nur durch die Spin-Spin-Relaxation bestimmt, vielmehr kommt es zu einer wesentlich schnelleren Dephasierung durch lokale Magnetfeldinhomogenitäten, die resultierende effektive Relaxation wird als T_2^* -Relaxation beschrieben. Der jeweiligen Bildgebungssequenz kommt neben der Ortskodierung die Wichtung des Bildes nach den oben beschriebenen Kontrastparametern zu.

Die bislang erfolgreichste Strategie zur Schaffung eines zellulären Kontrastes in der Magnetresonanztomographie (MRT) liegt in der Markierung von Zellen mit superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln [13, 14, 15, 16]. Die Kontrasterzeugung erfolgt durch die mittelbare Beeinflussung des Relaxationsverhaltens der umgebenden signalgebenden Protonen durch Suszeptibilitätseffekte der superparamagnetischen Magnetite, die den Kern der Nanopartikel bilden [17, 18]. Die Magnetite besitzen ein eigenes lokales magnetisches Moment, dies führt zu Inhomogenitäten innerhalb des angelegten äußeren Magnetfeldes B_0 . Nach dem Anregungspuls (RF-Puls) kommt zu einer schnelleren Dephasierung des Spins der umgebenden Protonen, dies resultiert in einer Reduktion der transversalen Relaxationszeit und somit zu Signalauslöschungen in T_2 - und T_2^* -gewichteten Bildgebungssequenzen. Eisenoxidpartikel bewirken zwar auch eine Reduktion der longitudinalen (T_1) Relaxation, jedoch sind sie in ihrer T_1 -Kontrastverstärkung reinen T_1 -Kontrastmitteln wie z.B. Gadoliniumderivaten unterlegen [19]. Die Dephasierung durch die superparamagnetischen Magnetite geht in ihrer Wirkung räumlich weit über die direkt benachbarten Wasserprotonen hinaus. Es kommt zu einem „blooming effect“, d.h. das Volumen der Signalauslöschungen übersteigt das tatsächliche Volumen der Eisenoxidnanopartikel bzw. der mit diesen Partikeln markierten Zellen [14]. Die Dephasierung der Protonenspins wird von dem Rephasierungspuls in einer T_2 -gewichteten Sequenz jedoch zum großen Teil wieder aufgehoben. Somit ist die Sensitivität der T_2^* -gewichteten Gradientenechobildgebung, bei der auf den Rephasierungspuls verzichtet wird, insgesamt als wesentlich größer anzusehen. Jedoch bietet die T_2 -gewichtete Bildgebung den großen Vorteil eines besseren morphologischen Kontrastes und einer größeren Unempfindlichkeit gegenüber Bildartefakten, die zum großen Teil ebenfalls durch Magnetfeldinhomogenitäten bedingt sind.

Die verschiedenen Typen von superparamagnetischen Eisenoxidnanopartikeln, seien es USPIO (ultra small superparamagnetic iron-oxide-particles), MION (monocrystalline iron oxide nanoparticles) [20] oder VSOP (very small

superparamagnetic iron-oxide-particles) [21] unterscheiden sich zum einen in der Größe ihres Kerns, zum anderen in der Zusammensetzung ihrer Hülle, die zur Abschirmung des Kerns vom umgebenden Medium bzw. Zytosol nötig ist. Mittels des Ansatzes der magnetischen Markierung von Zellen mit Eisenoxidnanopartikeln erfolgte die kernspintomographische Visualisierung der markierter Zellen zunächst *in vitro* [22] sowie *ex vivo* [23, 24]. Es konnte mit dieser Methodik nicht-invasiv zelluläre Migration dargestellt werden [23]. In späteren *in vivo* Studien konnte z.B. in einem Rattenmodell der cerebralen Ischämie mittels zellulärer Magnetresonanztomographie die Migration magnetisch markierter Stammzellen von der contralateralen Hemisphäre zum Ort der ischämischen Läsion gezeigt werden [25]. In das Gebiet molekularer Magnetresonanztomographie fällt z.B. die kernspintomographische Darstellung spezifischer Genexpression *in vivo* [26]. Auch die Anreicherung von systemisch injizierten Stammzellen aus dem Knochenmark in einem Modell einer corticalen Läsion [27] konnte kernspintomographisch dargestellt werden, sogar die Messung der Migrationsgeschwindigkeit magnetisch markierter Zellen aus der subventrikulären Zone war mittels zellulärer Magnetresonanztomographie möglich [28].

1.2 Morbus Parkinson und Stammzelltherapie

Das idiopathische Parkinson-Syndrom gehört mit einer Inzidenz von über 1,8 ‰ in der Gesamtbevölkerung und 10 ‰ in der Gruppe der über 65-Jährigen zu den häufigsten chronischen neurologischen Erkrankungen [29]. Das Erkrankungsalter liegt meist zwischen 40 und 60 Jahren, wobei das Alter selbst keinen ursächlichen Faktor darstellt. Die Ätiologie des Morbus Parkinson ist noch unbekannt, es gibt keine Befunde für eine immunologische oder virale Beteiligung. Eine genetische Ursache (Parkin-Gen) und Erblichkeit ist nur bei einem kleinen Teil der Patienten festzustellen. Als klinische Leitsymptome zeigen sich Tremor, Akinese und Rigor, dazu kommen depressive Verstimmungen und vegetative Begleitsymptome. Neuropathologisch zeigt sich eine fortschreitende, symmetrische Degeneration vor allem der dopaminergen Neuronen der Pars compacta der Substantia Nigra. Jedoch finden sich darüber hinaus auch Zelluntergang und Gliose in dem noradrenergen Locus coeruleus, im dorsalen Vaguskern, in der cholinergen Substantia innominata sowie im serotonergen Raphekern. Gleichzeitig treten in den überlebenden Nervenzellen

der betroffenen Regionen verstärkt sogenannte Lewy-Körperchen auf. Dies sind eosinophile, konzentrische zytoplasmatische Einschlüsse, die das Protein α -Synuklein enthalten. Der Nachweis der Lewy-Körperchen in diesen Lokalisationen ist Voraussetzung für die histopathologische Diagnose dieser Krankheit. Da Lewy-Körperchen jedoch auch in anderen Bereichen des Gehirns, wie dem Hirnstamm und der Hirnrinde beschrieben wurden und sich auch bei ca. 10 % der gesunden älteren Menschen finden lassen, bleibt ihre Bedeutung hinsichtlich der Ätiologie des Morbus Parkinson bislang ungeklärt.

Das Striatum zählt zu den Basalganglien. Es gehört zum extrapyramidalen System. Striatum und Substantia nigra stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen dem assoziativen und dem motorischen Großhirn dar. Funktionell bilden sie mit den anderen Basalganglien einen motorischen Regelkreis und sind für die Feinabstimmung der Bewegungen verantwortlich. Die dopaminergen Neurone der Substantia nigra projizieren direkt in das Striatum. Durch ihren Untergang kommt es dort zu einem Dopaminmangel, dies führt zu einer fortschreitenden Dysfunktion des motorischen Regelkreises und somit zu der motorischen Symptomatik. Der striatale Dopaminmangel lässt sich durch medikamentöse Gabe des Dopaminprecursors L-Dopa zu Beginn der Erkrankung ausgleichen. Der fortschreitende Zellverlust in der Substantia nigra im späteren Verlauf der Krankheit kann jedoch von dieser symptomatischen Therapie nur noch bedingt ausgeglichen werden, zusätzlich kommt es bei höheren Dosen von L-Dopa zu erheblichen Nebenwirkungen. Somit ist eine große Notwendigkeit eines restaurativen Ansatzes gegeben. Einen vielversprechenden Therapieansatz stellt die Transplantation von dopaminausschüttenden Zellen in das Striatum dar [2, 30]. Eine Wiederherstellung des motorischen Regelkreises ist jedoch nur dann möglich, wenn es zu einer funktionellen Integration der transplantierten Zellen kommt, d.h. zur Bildung von axonalen Verbindungen zu den striatalen Neuronen des Empfängers. Nur Stammzellen besitzen die dazu nötige Plastizität, sich in existierende neuronale Strukturen zu integrieren und zu dopaminergen Neuronen zu differenzieren. Experimentelle Studien an Tiermodellen des Morbus Parkinson zeigen, dass sowohl embryonale Stammzellen [1, 2], adulte Stammzellen [31] als auch fötale Mittelhirnzellen [32, 33] dazu in der Lage sind. Embryonale Stammzellen besitzen im Vergleich zu anderen Stammzellpopulationen jedoch die größte Plastizität [34]. Sie werden aus der inneren Zellmasse der Blastozyste entnommen und verfügen in der Zellkultur über eine nahezu unbegrenzte Teilungsfähigkeit. Sie sind pluripotent, d.h.

sie können in alle somatischen Zelltypen mit Ausnahme der Keimzellen differenzieren. Um embryonale Stammzellen in ihrem undifferenzierten Zustand zu halten, sind in der Zellkultur die Zugabe von Differenzierungshemmern und die Cokultur mit Fibroblasten nötig. Nach einer Transplantation von embryonalen Stammzellen in ein Empfängergewebe kommt es aufgrund der Depletion der Differenzierungshemmer zur Differenzierung. Anders als in der Vergangenheit postuliert kommt es jedoch nicht zu einer nennenswerten Beeinflussung der Differenzierung durch den Phänotyp der umgebenden Wirtszellen, jedoch zeigte sich eine Anhängigkeit der neuronalen Differenzierung von der Zelldichte des Transplantates [1]. Um den Anteil insbesondere der dopaminergen Neuronen zu erhöhen, der bei der ungerichteten Differenzierung *in vitro* bei weniger als 2 % liegt [35], ist es sinnvoll, die embryonalen Stammzellen vor der Transplantation *in vitro* bis zum Stadium von neuronalen oder sogar dopaminergen Vorläuferzellen zu differenzieren. Neben der Erhöhung der Rate an neuronalen bzw. dopaminergen Zellen ist eine Vordifferenzierung jedoch insbesondere im Zusammenhang mit dem erheblichen Risiko der Entstehung von Teratomen nach der Transplantation von undifferenzierten Stammzellen von hoher Wichtigkeit. Häufigkeiten der Teratomentstehung in Tiermodellen von bis zu 20 % haben humane klinische Transplantationsstudien bislang verhindert [36, 37]. Insbesondere ist zu bemerken, dass bei den meisten Transplantationsstudien bei Tiermodellen des Morbus Parkinson eine Xenotransplantation durchgeführt wurde, d.h. embryonale Stammzellen der Maus wurden in das Striatum von Ratten transplantiert. Bei Transplantationen allogener Zellen, wie selbstverständlich in zukünftigen humanen Studien, liegt das Risiko einer Teratomentstehung nochmals höher [38]. In jüngsten Studien konnte jedoch durch die neuronale Differenzierung der embryonalen Stammzellen in Verbindung mit der Applikation von Mitosehemmern eine Teratomentstehung verhindert werden [39]. Zur neuronalen Differenzierung existieren eine Reihe von Differenzierungsprotokollen, die entweder auf der zeitlich definierten Zugabe von Wachstumsfaktoren oder der Cokultivierung mit stromalen Zellen beruhen. Hier wurde das fünfschrittige Differenzierungsprotokoll von Lee et al. verwendet [35].

1.3 Cerebrale Ischämie und Stammzelltherapie

Schlaganfälle stellen die dritthäufigste Todesursache und die führende Ursache dauernder Invalidität dar. 80 % der Schlaganfälle sind ischämische Infarkte, d.h. Durchblutungsstörungen, die zur Ischämie in umschriebenen Gefäßterritorien des Gehirns führen. Das Gehirn ist auf eine kontinuierliche Sauerstoffversorgung angewiesen, da sein Energiestoffwechsel ausschließlich auf aerober Glykolyse basiert, es finden sich fast keine Sauerstoff und Glukosevorräte im Hirnparenchym. Bei einem Unterschreiten der Ischämieschwelle der lokalen Hirndurchblutung kommt es aufgrund der reduzierten Sauerstoffversorgung zu neurologischen Funktionsstörungen. Der zelluläre Funktionsstoffwechsel wird zunächst reversibel eingestellt. Bei einer weiteren Reduktion des pO_2 und Unterschreitung der Infarktschwelle kommt es zum Zusammenbrechen des Strukturstoffwechsels der Hirnzelle. Die zelluläre Integrität kann nicht mehr aufrechterhalten werden, die Zelle stirbt. Zur Festlegung der Ischämie- bzw. Infarktschwelle dient der zerebrale Blutfluss (CBF), dem Quotienten von Perfusionsdruck und Gefäßwiderstand. Der CBF-Bereich zwischen Infarkt- und Ischämieschwelle wird als Penumbra bezeichnet. Die Penumbra ist somit für die Therapie des ischämischen Schlaganfalls von besonderer Bedeutung, insbesondere auch für die zellbasierte regenerative Therapie. Die Ausdehnung der Penumbra kann durch diffusionsgewichtete MRT abgeschätzt werden, eine Abgrenzung zum Infarktareal bleibt jedoch schwierig.

Die Lokalisation des Gebietes der Minderperfusion im ZNS ist durch das Versorgungsgebiet der thrombosierten, das Hirngewebe penetrierenden Arterie bestimmt. Besonders häufig von Thrombosen betroffen ist die Arterie cerebri media (MCA), das Mediasymptom zeigt sich klinisch als armbetonte Hemiparese, Hemipaesthesie und Aphasie. In der vorliegenden Studie wurde in einem Mausmodell mittels einer transienten Okklusion der MCA mittels eines Fadens ein Mediainfarkt induziert.

Auch bei der Therapie der cerebralen Ischämie wird einem zellbasierten Ansatz großes Potential beigemessen. So konnte gezeigt werden, dass Progenitorzellen aus dem Knochenmark sowohl nach direkter intracerebraler als auch nach systemischer Injektion zum Randbereich des Infarkts migrieren. Dort führen sie zu einer Aktivierung endogener Reparaturmechanismen, im speziellen zur Aktivierung der Angiogenese, Neurogenese und Synaptogenese [40, 41]. Jüngste Studien zeigen darüber hinaus, dass transplantierte exogene Progenitorzellen aus dem

Knochenmark zur Aktivierung und Migration endogener neuronalen Stammzellen führen [42]. Neben Stammzellen haben auch mononukleäre Zellen restauratives Potential sowohl in experimentellen Modellen der cerebralen Ischämie [43], als auch - nach ihrer Differenzierung zu endothelialen Progenitorzellen - in Modellen vaskulärer Läsionen [44].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit sollte sein, sowohl die zelluläre magnetische Markierung zu optimieren, als auch den Einfluss dieser Markierung auf die Biologie der Zelle zu evaluieren. Es muss ausgeschlossen werden, dass die Beladung der Zellen mit Eisenoxidpartikeln die Viabilität und Differenzierungsfähigkeit der Stammzellen negativ beeinflusst. Eisen bzw. Eisenoxid interagiert mit einer ganzen Reihe von metabolen Stoffwechselwegen. Eine Erhöhung der zellulären Eisenkonzentration kann zu einem Anstieg der oxidativen Belastung der Zelle führen, zum oxidativen Stress. Insbesondere die Genese neurodegenerativer Erkrankungen wie z.B. Morbus Parkinson wird mit einer Erhöhung der oxidativen Belastung der Zellen in Zusammenhang gebracht [45, 46]. Bei einer intracerebralen Injektion eisenoxidmarkierter Zellen könnten sowohl die markierten Zellen selbst als auch im Falle der Lyse die Zellen des Empfängergewebes beeinträchtigt werden [47]. Um einen direkten Kontakt mit dem Zytosol zu vermeiden, ist der Eisenoxidkern der meisten Partikel mit polymerem Dextran oder monomerem Zitrat umhüllt, jedoch kann eine Metabolisierung dieser Hülle nicht ausgeschlossen werden [48]. Darüber hinaus muss im Falle der Transplantation embryonaler Stammzellen sichergestellt sein, dass die Differenzierungsfähigkeit der Stammzellen und damit die funktionelle Restaurierung neuronaler Strukturen im ZNS des Empfängers gewährleistet bleiben.

In allen bisherigen bildgebenden Transplantationsstudien wurden eine große Anzahl (10^5 - 10^6) magnetisch markierter Zellen transplantiert und visualisiert. Für ein besseres Verständnis der Migrationsdynamiken und zur Visualisierung *systemisch* injizierter Zellen ist es jedoch von großer Bedeutung, auch kleinere Zellzahlen (< 1000 Zellen) MR-tomographisch spezifisch zu erkennen. Die Sichtbarmachung einzelner magnetisch markierter Zellen konnte *in vitro* bereits nachgewiesen werden [15, 49]. Über das Detektionslimit magnetisch markierter Zellen *in vivo* existieren

jedoch nur Schätzungen. Die vorliegende Arbeit versucht im zweiten Abschnitt mittels Höchstfeld-MR-Bildgebung bei 17,6 T in Verbindung mit einer effektiven magnetischen Markierung die Grenzen der kernspintomographischen Bildgebung magnetisch markierter Stammzellen im lebenden Gehirn der Ratte zu bestimmen. Darüber hinaus wird auf die Feldstärkenabhängigkeit des Detektionslimits eingegangen, dies ist insbesondere im Hinblick auf die klinische Umsetzbarkeit der Methodik von Bedeutung.

Der dritte und vierte Teil der vorliegenden Studie soll zeigen, ob sich durch die Anwendung der oben beschriebenen Methodik der zellulären MR-Bildgebung biologisch bzw. therapeutisch wichtige Fragen der regenerativen Medizin beantworten lassen. Dabei sollte der Schwerpunkt im Falle der intrastriatalen Injektion magnetisch markierter embryonaler Stammzellen im Rattenmodell des Morbus Parkinson in dem Versuch der kernspintomographischen Detektion der exogenen Zellen über einen möglichst langen Zeitraum liegen. Es ist noch ungeklärt, wie lange sich magnetisch markierte Zellen *in vivo* visualisieren lassen. Ergänzt werden soll die Studie durch funktionelle Untersuchungen, um den restaurativen Effekt der Stammzelltransplantation zu erfassen. Darüber hinaus soll eine umfassende Histologie die Quelle von beobachteten kernspintomographischen Signalveränderungen zweifelsfrei klären und den Phänotyp der Stammzellen nach eventueller Differenzierung im Wirtsgewebe bestimmen.

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, ob mittels Magnetresonanztomographie eine Visualisierung *systemisch* injizierter mononukleärer Zellen in einem Mausmodell der cerebralen Ischämie möglich ist. Dabei ist der Ort der Anreicherung der Zellen unbekannt, die Zellen müssen von der akuten Pathologie sicher abgegrenzt werden. Es soll versucht werden, mittels Magnetresonanztomographie die Dynamik der Anreicherung der exogenen Zellen im Bereich der ischämischen Läsion zu erfassen.

2 Material und Methoden

2.1 Zelllinien und Methoden der Zellkultur

Embryonale Stammzellen (ESC). Murine embryonale Stammzellen (ESC) (CRL-1934, ATCC, Manassas, USA) wurden in DMEM-Medium mit 30 % durch Fibroblastenzellen (Feederzellen) (CRL-1503, ATCC) konditioniertem Medium, 15 % fötalem Kälberserum (PAA, Pasching, Österreich), 15 ng / ml Leucemia Inhibitory Factor (LIF) (Sigma-Aldrich, München), 0,1 mM 2-Mercaptoethanol und 1 % Penizillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich) kultiviert. Die Zellen wurden in 75 cm² Zellkulturflaschen in Zelldichten von $1,5 \times 10^6$ Zellen / 20 ml Medium bei 37° C und 5 % CO₂ gehalten und alle zwei Tage passagiert. Für die Experimente wurden nur undifferenzierte und nicht adhärente Zellen verwendet. Die Vitalität der ESC wurde wie auch bei allen folgenden Zelllinien durch Inkubation mit Trypan-Blau-Lösung (4 %) (Sigma-Aldrich) für drei Minuten bestimmt, die vitalen Zellen wurden in einer Neubauer-Kammer gezählt. Die Differenzierung der embryonalen Stammzellen zu neuronalen Vorläuferzellen wurde in einem fünfschrittigen Protokoll nach Lee et al. [35] durch die Depletion der Differenzierungshemmer und die Zugabe von Wachstumsfaktoren induziert. Die Identifizierung des Differenzierungsstadiums erfolgte über stadiumsspezifische primäre Antikörper. Dies sind stammzellenspezifische Antikörper (Anti-SSEA1) (Sigma), Antikörper gegen frühe neuronale Marker (Anti-Nestin, Anti β III-Tubulin) (beide von Sigma) und Antikörper gegen dopaminerge Marker (Anti-Tyrosin-Hydroxylase) (Sigma).

Makrophagen. Die Makrophagenzelllinie RAW 264.7 der Ratte wurde in RPMI-Medium (PAA) mit 10 % fötalem Kälberserum (PAA) und 1 % Glutamax (Gibco, Karlsruhe) bei 37° C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei Tage passagiert, die eingesetzte Zelldichte betrug 4×10^4 Zellen / cm².

Mononukleäre Zellen der Milz (MNC). Adulten 129/SV Mäusen (Bundesinstitut für Risikobewertung, BfR Berlin) bzw. C57/B6-GFP Mäusen, die GFP (green fluorescent protein) unter Kontrolle des chicken- β -actin-Promotors und des Cytomegalovirus Enhancers exprimieren [50], wurde die Milz explantiert und mechanisch aufgeschlossen. Die mononukleären Zellen wurden mit einem Ficoll Gradienten isoliert (Lympholite-M, Cedarlane). Die Zellen wurden von der AG Endres zur Verfügung gestellt.

Humane mononukleäre Zellen aus der Nabelschnur (HUCB). Proben von HUCB wurden aus verschiedenen Krankenhäusern in Leipzig unter Einhaltung der

ethischen Richtlinien erhalten. Zusätzlich wurden Proben von der Nabelschnurblutbank VITA34 im Rahmen einer Kooperation bezogen. Die mononukleären Zellen wurden mit einem Ficoll-Paque PLUS Gradienten (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) isoliert. Die Zellen wurden von Johannes Boltze, AG Prof. Emmrich, Leipzig zur Verfügung gestellt.

Mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark der Ratte (MBM). 11 männliche Wistar Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 275 und 320 g wurden in CO₂ getötet. Der Femur und die Tibia wurden entnommen und an beiden Enden eröffnet. Das Knochenmark wurde mit einer Spritze mit einer 21G Injektionsnadel herausgespült und bis zur Separation in RPMI 1640 Medium (Biochrome, Berlin) suspendiert. Die Separation der mononukleären Zellen erfolgte wie bei den HUCB. Die Zellen wurden von Johannes Boltze, AG Prof. Emmrich, Leipzig zur Verfügung gestellt.

Primäre Mittelhirnzellen der Ratte (E 14). Diese Zellen wurden im Rahmen einer Kooperation von Herrn Peer Lorenz zur Verfügung gestellt und nur für die initialen Aufnahmestudien verwandt.

2.2 Magnetische Markierung von Zellen

Zur magnetischen Markierung der Zellen wurden die Eisenoxidnanopartikel very small superparamagnetic iron oxide particles (VSOP C200, Ferropharm, Teltow) benutzt [51]. Die VSOP C200 Eisenoxidnanopartikel bestehen aus einem Eisenoxidkern mit einem Durchmesser von 5 nm, ähnlich den USPIO. VSOP sind mit einer Hülle aus monomerem Ziträt umgeben, der resultierende hydrodynamische Durchmesser beträgt 11 nm und sie tragen eine saure Oberflächenladung. Dieser hydrodynamische Durchmesser ist wesentlich kleiner als der Durchmesser der USPIO von 30-40 nm. Für die Confokale Laser Scanning Mikroskopie wurde ein Teil der Partikel mit dem fluoreszierenden Farbstoff Rhodamin-Succimidylester-Hydrochlorid (Molecular Probes, Eugene, USA) konjugiert.

Physikochemische Eigenschaften des Eisenoxidnanopartikels VSOP C200

Hüllstruktur	Zitrat Monomer
Kern	Eisenoxid
Kerndurchmesser	5 nm
Hydrodynamischer Durchmesser	11 nm
R1	22,5 l/mmol*s (bei 0.47 T)
R2	49,7 l/mmol*s (bei 0.47 T)
R1/R2	0,45

Die Inkubation der Zellen erfolgte direkt in den Zellkulturflaschen. Die Eisenoxidnanopartikel VSOP wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in das Kulturmedium pipettiert. Die Inkubation erfolgte über 90 min bei 37° C und 5 % CO₂. Nach der Inkubation wurden die Zellen geerntet und bei 1500 UPM (bei embryonalen Stammzellen 1000 UPM) zentrifugiert (Labofuge 400R, Heraeus-Sepatech, Osterode) und zweimal in PBS gewaschen.

Zur confokalen Laser-Scanning Mikroskopie wurden 1×10^5 embryonale Stammzellen in 3 ml Stammzellmedium ohne den Differenzierungshemmer LIF in 6-Loch-Platten (Falcon, BD Biosciences) ausgesät. Nach 24 h waren die meisten embryonalen Stammzellen adhärent. Es wurden nun Rhodamin-Grün-markierte VSOP Eisenoxidnanopartikel (Konjugation der Partikel siehe oben) in einer Konzentration von 1,5 mM dazugegeben und 1,5 h bei 5 % CO₂ und 37° C mit den Zellen inkubiert. Nach 45 min Inkubationszeit wurde zusätzlich der Fluoreszenzfarbstoff Di-8-ANEPPS (Molecular Probes), der spezifisch sowohl die äußere Zellmembran als auch intrazelluläre Membranen anfärbt, hinzupipettiert. Nach 1,5 h wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen um nicht aufgenommenen Eisenoxidnanopartikel und überschüssigen Fluoreszenzfarbstoff zu entfernen.

2.3 NMR-Relaxometrie und Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS)

Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit Eisenoxidnanopartikeln inkubiert und gewaschen. Nach der Bestimmung der Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer wurden die Zellen in PBS resuspendiert. Zwei Milliliter mit $0,6 \times 10^6$ Zellen wurden in ventilierte 14-ml Gefäße (Falcon, BD Biosciences, San Jose, USA) auf Eis gestellt. Die transversale Relaxationszeit (T2-Zeit) der Zellsuspension wurde durch den exponentiellen Fit des Signalabfalls einer Turbospin-Mulitechosequenz im Relaxometer (Minispec, Bruker, Ettlingen) bei 0,49 T bestimmt. Nach der Relaxometermessung wurde der Zellsuspension 1 ml HNO₃ (Merck, Darmstadt) und 10 µl H₂O₂ (Merck) zugegeben und die Zellen somit lysiert. Die lysierte Zellsuspension wurde gefiltert und der Eisengehalt durch Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) (Solaar, Unicam, Cambridge, UK) quantifiziert.

2.4 Confocale Laser-Scanning Mikroskopie

Das wichtigste Charakteristikum des confocalen Laser-Scanning Mikroskops (CLSM) (Leica) besteht im Gegensatz zu konventionellen Fluoreszenzmikroskopen in der genauen Festlegung der Focusebene. Vom Laser generiertes Licht definierter Wellenlänge wird über zwei galvanometrische Spiegel als beugungsbegrenzter Lichtpunkt durch das Objektiv sequentiell auf das Präparat fokussiert. Aus der Focusebene emittiertes Licht gelangt über einen Scanner zu verschiedenen Farbteilern, wo die Fluoreszenzemission wellenspezifisch diskriminiert und pixelweise auf die Detektoren (Photomultiplier) verteilt wird. Bei der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie tragen neben dem emittierten Licht aus der Focusebene alle Photonen, die ober- und unterhalb der focalen Ebene emittiert werden, zur Bildentstehung bei. Beim CLSM ermöglicht eine variable Lochblende die ausschließliche Detektion von Licht aus der focalen Ebene, während alle Photonen, die nicht aus der Ebene stammen, wirkungsvoll ausgeblendet werden. Somit ist eine genaue räumliche Lokalisation subzellulärer Strukturen in allen drei Raumrichtungen möglich.

Zur intrazellulären Lokalisation der Rhodamin-Grün-markierten Eisenoxidnanopartikel wurden die Stammzellen nach der Inkubation (siehe oben) mittels eines 20-fachen Immersionsobjektiv (NA 0,5, Leica) untersucht. Es wurden zwei Frequenzkanäle simultan detektiert, der erste Kanal (510 - 560 nm) beinhaltet das

Emissionsmaximum von Rhodamin-Green, der zweite Kanal (610 - 670 nm) das Emissionsmaximum von Di-8-ANEPPS.

Zur Detektion der GFP-positiven exogenen Zellen *in situ* wurden ebenfalls zwei Fluoreszenzkanäle simultan aufgenommen. Der erste Kanal (500 - 550 nm) beinhaltet das Emissionsmaximum des GFP bei 508 nm. Der zweite Kanal (610 - 670 nm) beinhaltet das Emissionsmaximum des rot fluoreszierenden Sekundärantikörpers (Sigma) zur Phänotypisierung.

2.5 Präparation der Gelphantome

Zur Herstellung der Gelphantome für die *in vitro* MRT-Studien wurde 1,5 g Agar (Qbiogene, Heidelberg) in 100 ml TBE-Puffer (Qbiogene) gelöst. Die Suspension magnetisch markierter Zellen wurde entweder in das Gel injiziert (Injektionsphantom), oder die Zellen wurden in dünnen Schichten in das Gel eingebracht (Schichtphantom). Für die Injektionsphantome wurden 12 ml des heißen Gels in 15 ml Falcon Gefäße gegossen und unmittelbar danach bei 3000 UPM für 5 min zentrifugiert um Luftblasen zu entfernen. 2 µl der Zellsuspension mit definierter Zellzahl (Bestimmung der Zellzahl siehe oben) wurden mittels einer Hamilton Microspritze, ausgestattet mit einer 26iger Nadel in das Gel injiziert. Nach der Injektion wurde die Nadel vorsichtig retrahiert. Pro Gel wurden vier Injektionen durchgeführt. Die Gele wurden bei 800 UPM für 4 min zentrifugiert, um Luftblasen aus den Injektionskanälen zu entfernen.

Zur Herstellung der Schichtphantome wurden 20 ml der flüssigen 1,5 %igen Agarose in ein 50 ml Falcon gegossen und sofort bei 3000 UPM für 4 Minuten zentrifugiert. Nach dem Erhärten der ersten Schicht wurde die benötigte Zahl vitaler Zellen (100, 1.000 oder 10.000 Zellen) in 50 µl Medium aufgenommen und mit 50 µl flüssiger Agarose vermischt. Dabei sollte die Agarose zwar flüssig aber dennoch so kühl wie möglich sein, um eine sofortige Lyse der Zellen zu verhindern. Diese 0,75 % -ige Agarose-Zellsuspension wurde auf die ausgekühlte Grundschrift pipettiert und sofort für 4 Minuten bei 3000 UPM zentrifugiert. Nach dem Abkühlen folgte eine weitere Agaroseschicht, auf die eine zweite Zellschicht wie oben beschrieben aufgebracht wurde. Insgesamt wurden bis zu vier Zellschichten in ein Gelphantom eingebracht.

2.6 Bestimmung der zellulären oxidativen Belastung

Als Maß für den zellulären oxidativen Stress wurden sowohl die Konzentrationen von Malondialdehyd (MDA), einem Zwischenprodukt der Lipidperoxidation, und Proteincarbonylen, den Produkten der Proteinoxidation gemessen [52]. Zusammengefasst wurden die Zellsuspensionen in Gegenwart von 2-Thiobarbitursäure und butyliertem Hydroxytoluol für 60 min gekocht. Anschließend wurde die Reaktion durch Kühlung der Proben in einem Eisbad gestoppt. Vor der HPLC- (High Performance Liquid Chromatography) Analyse wurden die Proben neutralisiert. Die Proben wurden in einem isokratischen RP-(Reversed Phase) HPLC-System unter Verwendung eines Kaliumphosphat-Puffer / Methanol-Elutionsmittels analysiert. Dafür wurde eine Supercosil 150 x 4 mm LC-18-S (5 µm) Säule benutzt. Der Nachweis erfolgte über Fluoreszenzmessung (Anregung: 525 nm, Emission: 550 nm). Die Bestimmung des oxidativen Stress erfolgte in Kooperation mit der AG PD Dr. Grune, Universität Düsseldorf.

2.7 6-OHDA-Läsion der Ratte

Es wurde eine linksseitige, unilaterale, MFB-(middle forebrain bundle) Läsion durchgeführt.

Die Ratten wurden mit einem Gewicht von 180 bis 200 g lädiert. Die Narkotisierung der Tiere erfolgte durch intraperitoneal appliziertes Pentobarbital (Dosis 32 mg / kg KG, Substanz in 0,9 % NaCl-Lösung). Nach Rasur und Desinfektion der Kopfhaut wurden die Tiere in einem stereotaktischen Rahmen (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) platziert und durch die Interauralstifte und den Incisorstift fixiert. Anschließend erfolgte die linksseitige, paramediane Inzision der Kopfhaut und die Freilegung des Periostes. Entsprechend den nachfolgend aufgeführten stereotaktischen Koordinaten für die striatalen Läsionspunkte wurde der Schädelsknochen über der betreffenden Hirnregion, also gemäß den anterioren (A) und lateralen (L) Koordinaten, mittels eines Dentalbohrers trepaniert.

Koordinaten MFB in Bezug auf das Bregma nach Paxinos & Watson (1986):

TB: -2,4

AP: 4,1

ML: 1,1

DV: -7,7

Nach Entfernung der Dura mater unter der Trepanationstelle wurde die an einem stereotaktischen Arm fixierte Injektionskanüle (Außendurchmesser 0,23 mm), die über einen Polyethylenschlauch mit einer Hamilton-Mikroliterspritze des Typs CR 400-20 (Hamilton 21 Company, Reno, USA) verbunden war, langsam durch das Bohrloch in das MFB (entsprechend den ventralen [V] Koordinaten) vorgeschoben. Anschließend erfolgte die langsame Applikation (Volumen 2 µl, Applikationsgeschwindigkeit 1 µl / min) der 6-OHDA-Lösung (3,5 µg / µl, Substanz in 0,9 % NaCl-Lösung mit 0,1 % Ascorbatanteil). Nach Injektion des o.g. Volumens verblieb die Kanüle noch für 2 min in entsprechender Position, bevor sie langsam retrahiert wurde. Die insgesamt applizierte Dosis an 6-OHDA betrug 28 µg. Die Operation endete mit dem Wundverschluß durch einreihige Naht. Postoperativ erhielten die Ratten 50 µl Novaminsulfon (Metamizol-Na, ratiopharm, Deutschland) zur Analgesie. Die 6-OHDA-Läsion wurde von dem Tierarzt Peer Lorenz durchgeführt.

2.8 Stereotaktische Transplantation magnetisch markierter Stammzellen

Die jeweilige Anzahl magnetisch markierter embryonaler Stammzellen wurde in 2 µl PBS gelöst. Weibliche Wistar-Ratten (Charles River WIGA, Sulzfeld) wurden mit einer Isofluran-Gasnarkose narkotisiert. In tiefer Narkose wurden die Ratten in einen stereotaktischen Rahmen fixiert. Jede Ratte erhielt eine Injektion von 2 µl Zellsuspension mittels einer Hamilton Mikrospritze (1 µl / 2 min) in das Striatum der linken Hemisphäre (stereotaktische Koordinaten vom Bregma: AP -0,5; ML 4,0; DV -5,0). Nach der Injektion wurde die Nadel für 10 min am Injektionsort belassen, anschließend wurde sie langsam retrahiert. Die Operation endete mit dem Wundverschluß durch einreihige Naht. Postoperativ erhielten die Ratten 50 µl Novaminsulfon (Metamizol-Na, Ratiopharm, Deutschland) zur Analgesie.

2.9 Amphetamininduzierte Rotation

Zur Objektivierung der Läsionsstärke *intra vitam* wurden die Ratten auf ihr substanzinduziertes Rotationsverhalten untersucht.

Die Prüfung erfolgte 4 Wochen *post lesionem* sowie 10 Wochen nach der Transplantation mit Amphetamin. Dazu wurden die Tiere einzeln in standardisierten, mit einem Bewegungssensor ausgestatteten Rotameterhalbschalen (TSE, Bad

Homburg, Deutschland) gesetzt. Die Verbindung der Ratte mit dem Bewegungssensor wurde durch einen semiflexiblen, doppelt gewindelten Stahldraht gewährleistet. Über ein Computerprogramm erfolgte die Berechnung des Netto-Rotations-Asymmetrie (rechts/links)-Scores, ausgedrückt als Körperumdrehung mit einem Drehwinkel ≥ 180 Grad pro Minute. Die Aufzeichnung der Bewegungen / Rotationen erfolgte nach einer 5- minütigen Anflutungsphase für das Pharmakon und wurde für 60 Minuten gemessen. Die Applikation von Amphetamin (Dosis: 2,0 mg / kg KG, Substanz gelöst in 0,9 % NaCl-Lösung, Injektionsvolumen 0,5 ml / kg KG) erfolgte intraperitoneal. Die amphetamininduzierte Rotation wurde in Zusammenarbeit mit dem Tierarzt Peer Lorenz durchgeführt.

2.10 Bildgebungsstudie an einem 6-OHDA-Modell der Ratte

Insgesamt wurden 13 weibliche Wistar-Ratten in die Studie aufgenommen. Alle Tiere wurden mittels 6-OHDA unilateral läsioniert (siehe oben). 4 Wochen *post lesionem* wurde das amphetamininduzierte Rotationsverhalten gemessen. Die Tiere wurden in drei experimentelle Gruppen unterteilt. 6 Tieren wurden 1×10^5 , einem Tier 1×10^4 magnetisch markierte murine embryonale Stammzellen (ESC) intrastriatal injiziert. Die Stammzellen wurden zuvor stabil mit eGFP transfiziert (Zusammenarbeit mit dem Institut für Immunologie, Charité Campus Mitte). Die intrastriatale Injektion wurde wie oben dargelegt durchgeführt. 6 weitere Tiere dienten als Kontrollgruppe, sie erhielten eine intrastriatale Injektion von physiologischer Kochsalzlösung. Die intrastriatalen Injektionen wurden von dem Tierarzt Peer Lorenz wie oben dargelegt durchgeführt. Die beiden Gruppen mit jeweils sechs Tieren wurden so zusammengestellt, dass die Anzahl der amphetamininduzierten Rotationen / min, summiert über alle Tiere in jeder Gruppe möglichst übereinstimmte.

Alle Tiere wurden insgesamt jeweils 4 Mal kernspintomographisch untersucht, in der 1., der 8., der 16. und der 24. Woche nach Transplantation. Eine kernspintomographische Messung unmittelbar nach Transplantation war nicht möglich, da die Tiere bereits durch den operativen Eingriff zur intrastriatalen Injektion stark geschwächt waren, eine sich anschließende zweistündige Narkose zur kernspintomographischen Bildgebung war unter diesen Umständen abzulehnen.

Um eine funktionelle Restaurierung der dopaminergen Funktionalität zu erfassen, erfolgte 10 Wochen nach Transplantation eine zweite Messung des amphetamininduzierten Rotationsverhaltens.

6 Monate (24 Wochen) nach Transplantation wurden die Tiere getötet und es erfolgte die histologische Aufarbeitung.

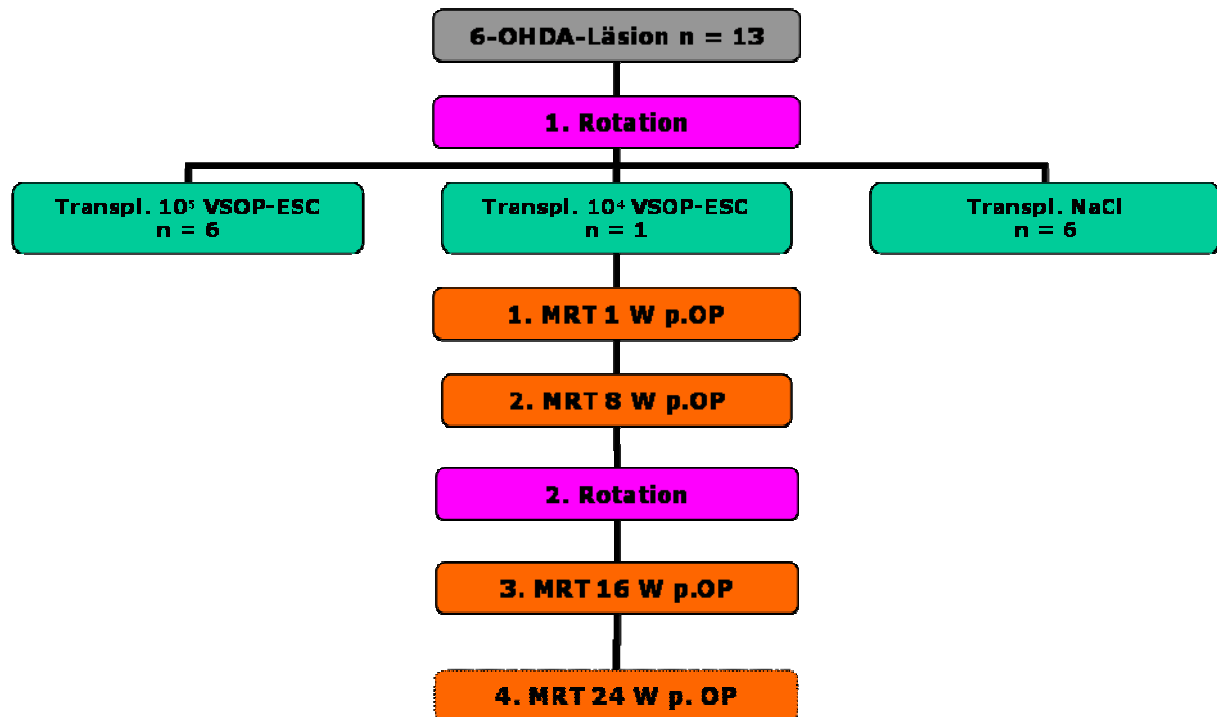


Abbildung 2: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs der Visualisierungsstudie magnetisch markierter embryonaler Stammzellen in einem Rattenmodell des Morbus Parkinson.

2.11 Bildgebungsstudie an einem Mausmodell der cerebralen Ischämie

Allen Empfängermausen wurde eine Woche vor Induktion der zerebralen Ischämie in tiefer Narkose die Milz entfernt. Die Splenektomie ist nötig, um eine längere vaskuläre Passage der im späteren Verlauf der Studie injizierten exogenen mononukleären Zellen zu gewährleisten. Die Mäuse wurden mittels Isofluran-Gasnarkose anästhesiert. Mittels eines Fadens wurde bei insgesamt 45 Mäusen die linke Arteria cerebri media für 30 min (n = 36 Mäuse) bzw. 60 min (n = 9) okkludiert. Nach der Okklusion wurde der Faden wieder entfernt, es erfolgte eine Reperfusion.

Eine Zellsuspension aus 1×10^6 mononukleären Zellen aus der Milz (MNC), gelöst in 200 μ l physiologischer Kochsalzlösung, wurde den Mäusen in tiefer Narkose intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die operativen Eingriffe wurden von Mitarbeitern der AG Prof. Endres durchgeführt. Insgesamt wurden 45 Mäuse in die Studie aufgenommen. Davon dienten 12 Tiere der histologischen Phänotypisierung der injizierten Zellen. Kernspintomographische Untersuchungen wurden an 33 Tieren durchgeführt. Davon erhielten 20 Mäuse VSOP-markierte MNC, in einer Teilgruppe davon waren die Zellen zusätzlich GFP-transfiziert. 9 Mäuse erhielten nur NaCl ohne Zellen (Kontrolle) und vier Mäusen wurde freies VSOP injiziert. Von diesen wurde zwei Tieren VSOP in der maximal tolerablen Konzentration von 100 μ M Fe / kg Körpergewicht injiziert, den anderen zwei Tieren wurde VSOP in einer Konzentration injiziert, die der von 1×10^6 MNC intrazellulär aufgenommenen Eisenmenge entspricht (0,1 μ M Fe / kg). Den Mäusen wurden die Zellen 0,5 h, 8 h bzw. 24 h nach der Induktion der cerebralen Ischämie injiziert (siehe Abbildung 3).

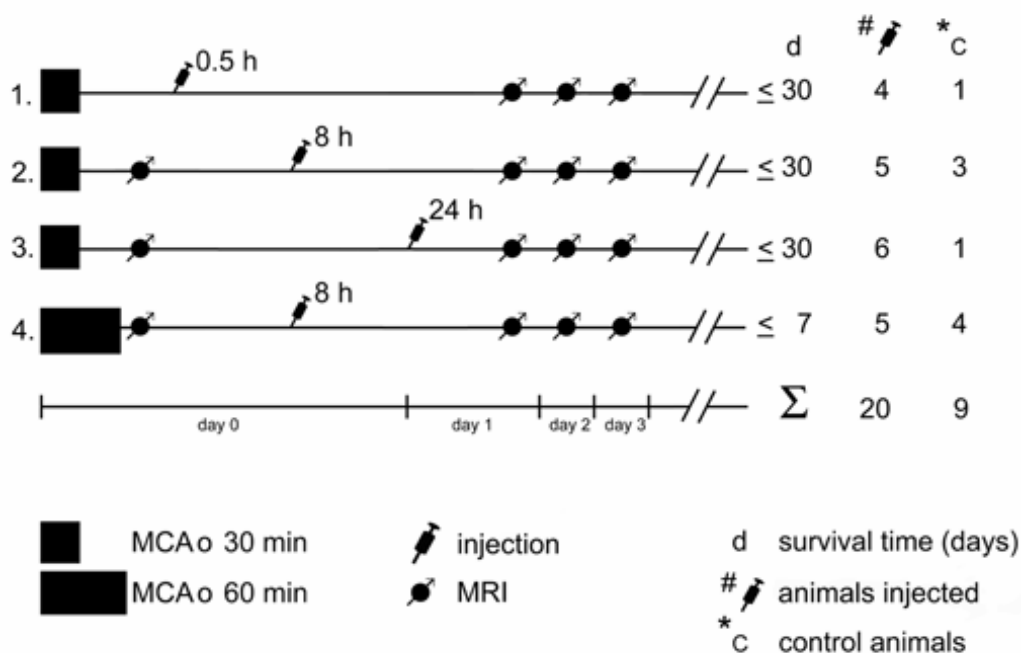


Abbildung 3: Schematischer Überblick über den zeitlichen Ablauf der Induktion der Ischämie (MCAO), der Injektion der mononukleären Zellen (MNC) und der kernspintomographischen Bildgebung.

Beinahe alle Tiere wurden nach der Induktion der cerebralen Ischämie (MCAO), aber vor Injektion der Zellen kernspintomographisch untersucht, lediglich bei Tieren, die bereits 0,5 h nach MCAO die Zellen erhielten, musste darauf verzichtet werden. Darauf folgend wurden alle Tiere in den ersten drei Tagen täglich

kernspintomographisch untersucht, gefolgt von 2 Untersuchungen in der Woche bis zum Ende des Experiments nach bis zu 37 Tagen.

2.12 Magnetresonanztomographie bei 1,5 und 7 Tesla

Bildgebung der Ratte bei 1,5 T: Die Bildgebung erfolgte an einem klinischen 1,5 T MR-Tomographen (Siemens Sonata). Die Tiere wurden mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin-Rompun narkotisiert. Für die Messung wurde den Tieren die small-loop-Spule (Fingerspule) mittels Klebeband flach auf dem Kopf befestigt. Zur Bildgebung wurden 2D-steady-state-Gradientenechosequenzen verwendet (TR / TE 35,0 / 17,1 ms). Die Akquisitionszeit betrug ca. 20 min, die realisierte räumliche Auflösung 300×300×500 µm.

Bildgebung der Ratte bei 7 T: Die Bildgebung erfolgte an einem 7 T Kernspintomographen für Kleintiere (Bruker Pharmascan, Ettlingen) mit einer 68 mm Rattenkopfspule. Die Tiere wurden mittels Isofluran und 100 % O₂ als Trägergas narkotisiert. Die Lagerung erfolgte auf einem Wärmebett, dieses wurde mit 35° warmem Wasser beheizt. Zur Überwachung der Narkosetiefe während der kernspintomographischen Messung wurde die Atmungsfrequenz der Tiere mittels eines Brustpads (Bruker Bio-Trig) gemessen. Es wurden T2*-gewichtete 2D-Gradientenechoaufnahmen (GRE) (TR / TE = 400,4 / 5,4 ms) mit einer räumlichen Auflösung von 117×117×400 µm und einer Messzeit von 22 min akquiriert. Zusätzlich wurden T2*-gewichtete FLASH 3D steady-state Sequenzen (TR / TE = 15,0 / TE 6,0 ms; Flip Angle (FA) = 30°) mit einer im Vergleich zur 2D-Sequenz höheren räumlichen Auflösung von 161×194×194 µm, jedoch geringerem Signal-zu-Rausch Verhältnis (SNR) und einer Messzeit von 42 min aufgenommen. Zur Berechnung der T2-Karten wurde eine T2-gewichtete Turbospin-Multiechosequenz (TR / TE = 5456 / 8,5 ms) mit acht Echos und einer Auflösung von 137×137×600 µm verwendet.

Bildgebung der Maus bei 7 T: Für die kernspintomographischen Untersuchungen (Pharmascan, Bruker Biospin) wurden die Tiere mit ca. 1 % Isofluran mittels 100 % O₂ als Trägergas narkotisiert. Die Mäuse wurden in das Zentrum einer 68 mm Spule platziert. Die Atmung wurde mit einem Bio-Trig-Monitoring-System (Bruker) überwacht. Für die T2-gewichtete Bildgebung wurde eine 2D Turbo Spin-Echo-Sequenz verwendet (TR / TE = 5109 / 65,2 ms). Es wurde eine 1282-Matrix mit einer Auflösung in der Ebene von 156 µm und einer Schichtdicke von 0,4 mm realisiert. Es

wurde das gesamte Gehirn exklusive des anterioren Bulbus olfactorius und des Cerebellum erfasst. Für die T2*-gewichtete Bildgebung wurde 2D-Gradientenecho Sequenz (TR / TE = 468,1 / 5,4 ms) verwendet. Die Schichtgeometrie wurde von der T2-gewichteten Sequenz importiert um eine direkte räumliche Korrelation zwischen den beiden Bildgebungssequenzen zu ermöglichen. Lediglich die Matrix wurde aufgrund des besseren Signal-zu-Rausch Verhältnissen auf 1502 erhöht, dies führte zu einer Auflösung in der Ebene von 133 μm . Bei 8 Tieren wurden zusätzlich T2*-gewichtete Bildgebungssequenzen mit längeren Echozeiten von 10,4 und 15,4 ms akquiriert. Die 3D-Volumenrekonstruktion der T2-Hyperintensitäten und T2*-Hypointensitäten wurde mit dem Visualisierungsprogramm AMIRA (T65, San Diego, USA) durchgeführt.

2.13 MR-Bildgebung zum zellulären Detektionslimit bei 17,6 Tesla

Die kernspintomographische Studie wurde an gesunden weiblichen Wistar-Ratten (130 – 150 g) (Charles River) durchgeführt. Die intrastriatale Injektion der magnetisch markierten Stammzellen erfolgte wie oben dargelegt. 17 Tiere wurden transplantiert, davon erhielten 6 Tiere 1000 unmarkierte Zellen und 11 Tiere magnetisch markierte Zellen (1 Tier 120.000; 3 Tiere 1000; 3 Tiere 100 und 4 Tiere 20 Zellen).

Die kernspintomographische Bildgebung bei 17,6 T wurde mit einem 750 MHz MR-Spektrometer (Bruker, Rheinstetten) mit weiter Bohrung und einem Bildgebungsgradientensystem mit einer maximalen Gradientenstärke von 200 mT / m durchgeführt. Eine 38 mm birdcage-Spule wurde eingesetzt. Die Tiere wurden mittels einer Isofluran-Gasnarkose anästhesiert, Atmung und Herzschlag wurden überwacht. Es wurden mindestens zwei hochaufgelöste 3D-Gradientenecho-Bildgebungsexperimente durchgeführt. Zunächst wurde ein 3D-Datensatz mit einer isotropen Auflösung von 98 μm und einer 256^3 Matrix des gesamten Gehirns aufgenommen (TE / TR = 3,0 / 20 ms, Akquisitionszeit 22 min). Nach der Identifikation des Injektionskanals wurde ein zweiter 3D-Datensatz mit einer isotropen Auflösung von 98 μm jedoch einem kleineren field-of-view aufgenommen (TE / TR = 4,6 / 15 ms, Akquisitionszeit 32 min). Das Signal-Rausch-Verhältnis betrug in der grauen Substanz circa 20-30:1. Alle Tiere wurden direkt nach der Transplantation kernspintomographisch untersucht, einige erhielten wiederholte Untersuchungen bis zu 4 Wochen nach der Transplantation.

2.14 Histologie und Immunhistochemie

Detektion embryonaler Stammzellen nach intrastriateller Injektion bei der Ratte.

Direkt nach der letzten Bildgebungssequenz wurden die Ratten in tiefer Narkose mit einer Überdosis Pentobarbital getötet und für die Paraffineinbettung perfundiert oder für den Gefrierschnitt präpariert. Für die Gefrierschnitte wurde das Gehirn in flüssigem Stickstoff eingefroren und es wurden 15 µm bzw. 25 µm (Detektion des Stammzellmarkers SSEA1) dicke serielle Schnitte auf einem Jung Kryostaten angefertigt (Leica, Bensheim). Sechs Tiere mit Überlebenszeiten von 3 Wochen wurden mit 250 ml 10 % Phospat-gepuffertem Formalin transkardial perfundiert. Nach Entnahme wurden die Gehirne in Formalin gelagert. Es wurden nach der Einbettung in Paraffin 6 µm dicke serielle Schnitte in der Umgebung des Stichkanals angefertigt. Die Schnitte wurden mit Hematoxylin/Eosin gefärbt, zusätzlich wurde eine Berliner-Blau Färbung zum Eisennachweis durchgeführt. Immunhistochemie wurde mittels der ABC-Methode und primärer Antikörpern gegen GFAP (Sigma), MIB (Ki67) und dem Stammzellmarker SSEA1 (Sigma) durchgeführt. Die Präparation der Schnitte erfolgte in Zusammenarbeit mit der AG Prof. Schober, Leipzig.

Detektion mononukleärer Zellen aus der Milz nach Injektion in ein MCAO-Mausmodell. Innerhalb von 24 h nach der letzten Bildgebung wurden die Mäuse in tiefer Narkose mit einer Überdosis Chlorhydrat getötet und mit 4 % phospatgepuffertem Paraformaldehyd transkardial perfundiert. Mittels eines Mikrotoms (Leica) wurden 40 µm dicke coronale Schnitte angefertigt. Zum Eisennachweis wurde eine Berliner-Blau Färbung durchgeführt. Zur Immunhistochemischen Phänotypisierung der Berliner-Blau-positiven Zellen wurden primäre Antikörper gegen GFP (AdvancelImmunoChemical, Long Beach, USA) (Zur Verstärkung des GFP-Signals), Maus-NeuN (Chemicon, Temecula, USA), GFAP (AdvancedImmunoChemical) und von Willebrand Faktor (Abcam, Cambridge, UK) verwendet. Zur Detektion mittels Confokaler Laser-Scanning-Mikroskopie wurde ein fluoreszierender Sekundärantikörper (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) verwendet. Die Präparation der Schnitte erfolgte in Zusammenarbeit mit der AG Prof. Endres.

3 Untersuchungen zur magnetischen Markierung von Zellen in vitro durch Eisenoxidnanopartikel

Fragestellung

Für eine sensitive und spezifische kernspintomographische Visualisierung transplanterter Zellen ist es nötig, einen möglichst hohen Bildkontrast zwischen den Zellen und dem umgebenden Hirnparenchym zu erreichen. Der effektive Bildkontrast sollte sich proportional zur Menge an aufgenommenen Eisen verhalten. Hinsichtlich dieser kernspintomographischen Visualisierbarkeit wäre somit das Ziel, eine möglichst hohe Beladung der Zellen mit den Eisenoxidpartikeln VSOP zu erreichen. Letztendlich soll jedoch dieser Ansatz zellulärer MR-Bildgebung wie oben dargelegt dazu dienen, biologisch bzw. medizinisch relevante Fragestellungen der Transplantationsmedizin zu beantworten. Hierzu muss jedoch gewährleistet sein, dass die magnetische Markierung keinen signifikanten Einfluss auf die Biologie der Zellen ausübt. Natürlich kann nur eine Auswahl an Vitalitäts- und Funktionsparametern überprüft werden. Die Auswahl der Parameter erfolgte jedoch sowohl unter Berücksichtigung des Therapieziels als auch in dem Bewusstsein, dass es am Ort der Transplantation durch die Lyse der transplantierten Zellen zu einer Freisetzung der Eisenoxidnanopartikel und somit zur sekundären Phagozytose durch Wirtszellen kommen kann. Im Einzelnen wurde versucht folgenden Fragen durch *in vitro* Untersuchungen zu beantworten:

- Wie ist die optimale Inkubationskonzentration und Inkubationszeit mit VSOP für die jeweilige Zellpopulation?
- Inwieweit ist die Reduktion der T2-Zeit proportional zur Menge des inkorporierten Eisen?
- Kann die intrazelluläre Eisenaufnahme durch Lipofektion erhöht werden?
- In welches intrazelluläre Kompartiment werden die Eisenoxidnanopartikel aufgenommen?
- Lassen sich aus der T2-Zeit weiterreichende Aussagen über die Vitalität von Zellen gewinnen?
- Beeinflusst die magnetische Markierung die Vitalität oder Proliferationsrate der markierten Zellen?
- Findet sich eine Erhöhung des oxidativen Stress *in vitro*?

- Beeinflusst die magnetische Markierung die Differenzierungsfähigkeit embryonaler Stammzellen?

3.1 Magnetische Markierung von Zellpopulationen mit Eisenoxidnanopartikeln VSOP

Zu Beginn der Studie wurden zwei verschiedene VSOP Eisenoxidnanopartikel hinsichtlich ihrer Eignung zur zellulären magnetischen Markierung miteinander verglichen. VSOP C184 bestehen aus einem Eisenoxidkern mit einem Durchmesser von 4 nm, mit der umgebenden monomeren Zitrathülle ergibt sich ein hydrodynamischer Durchmesser von 7 nm. VSOP C200 hingegen sind bei gleicher Zusammensetzung von Kern und Hülle deutlich größer, der Kerndurchmesser beträgt 5 nm, der hydrodynamische Durchmesser des Partikels inklusive Hülle 11 nm.

Es wurden embryonale Mittelhirnzellen der Ratten mit verschiedenen Konzentrationen der Eisenoxidnanopartikel für 90 min inkubiert. Die Inkubationszeit von 90 min hatte sich in früheren Studien der Arbeitsgruppe als am besten geeignet herausgestellt [51], somit wurden zu Beginn dieser Arbeit 90 min als Anfangswert ausgewählt. Um die Effektivität der magnetischen Markierung zu quantifizieren, wurde die charakteristische Zeitkonstante der transversalen Relaxationszeit (T2-Zeit) der Zellsuspension mittels NMR-Relaxometrie gemessen. Als Kontrollwert dienten unmarkierte Zellen in gleicher Zellzahl, dies wurde auch in den nachfolgenden Zellaufnahmestudien beibehalten. Es zeigte sich sowohl nach Inkubation mit den Partikeln VSOP C200 als auch mit den Partikeln C184 eine signifikante Reduktion der T2-Zeit nach Inkubation mit 1,5 mM Substanz (Abbildung 4). Zwischen den beiden Partikeln zeigten sich bei einer Inkubation mit 3 bzw. 6 mM ein signifikanter Unterschied, die Partikel C200 führen zu wesentlich geringeren T2-Zeiten der jeweiligen Zellsuspension, es findet sich eine inverse Proportionalität zwischen der Inkubationskonzentration und der transversalen Relaxationszeit, wohingegen bei den Partikeln C184 Sättigung vorliegt. Für die weiteren Studien wurden somit die Eisenoxidnanopartikel VSOP C200 für die magnetische Markierung der Zellen ausgewählt, zumal sich keine Unterschiede zwischen den Partikeln hinsichtlich der Vitalität der Zellen zeigten.

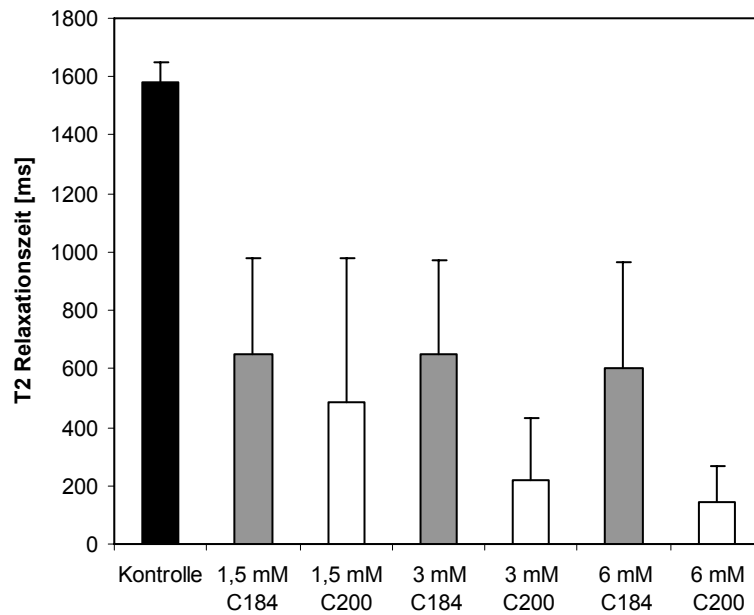


Abbildung 4: Inkubation primärer embryonaler Mittelhirnzellen der Ratte (E 14) ($2,5 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz) mit zwei verschiedenen zitratbeschichteten Eisenoxidnanopartikeln VSOP C184 und VSOP C200. Die Inkubation erfolgte bei 37°C im Schüttelinkubator für 90 min. Es sind wie auch bei allen folgenden NMR- und AAS-Messungen der Mittelwert und die Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier Einzelmessungen dargestellt.

Es wurde eine Vielzahl von Zellpopulationen hinsichtlich ihrer magnetischen Markierungsfähigkeit untersucht. Dazu gehören neben Primärzellen wie fötalen Mittelhirnzellen auch immortalisierte Zellen, als Beispiel seien Makrophagen der Ratte (Zelllinie RAW) genannt. Das Hauptaugenmerk dieser Studie liegt jedoch in Untersuchungen zur magnetischen Markierbarkeit von Stammzellen und mononukleären Zellen. Dazu gehören murine embryonale Stammzellen (ESC), humane mononukleäre Zellen aus der Nabelschnur (HUCB), mononukleäre Zellen der murinen Milz (MNC), sowie mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark der Ratte (MBM).

Murine embryonale Stammzellen (ESC) zeigen einen signifikanten Abfall der transversalen Relaxationszeit (T2-Zeit) nach Inkubation mit den Eisenoxidnanopartikeln VSOP C200 für 90 min (Abb. 5 a, schwarze Balken). Der Abfall der Relaxationszeit ist invers proportional zur Konzentration der Eisenoxid-Partikel während der Inkubation. Die gemittelte Relaxationszeit der Zellsuspension verkürzt sich auf 34 % (1,5 mM VSOP) bzw. 25 % (3 mM VSOP) des Kontrollwertes (unmarkierte embryonale Stammzellen).

Mononukleäre Zellen aus humanem Nabelschnurblut (HUCB) bzw. mononukleäre Zellen des Rückenmarks der Ratte (MBM) zeigen im Vergleich zu embryonalen Stammzellen eine wesentlich geringere Reduktion der T2-Zeit. Erst eine Erhöhung der Inkubationskonzentration auf 6 mM führt zu einer deutlichen Reduktion der T2-Zeit. Eine weitere Verdopplung der Inkubationskonzentration von 6 auf 12 mM VSOP resultiert in keiner weiteren Reduktion der T2-Zeit, es liegt Sättigung vor (Abb. 5). Mononukleäre Zellen aus der Milz (MNC) zeigen eine nahezu identische Aufnahmecharakteristik.

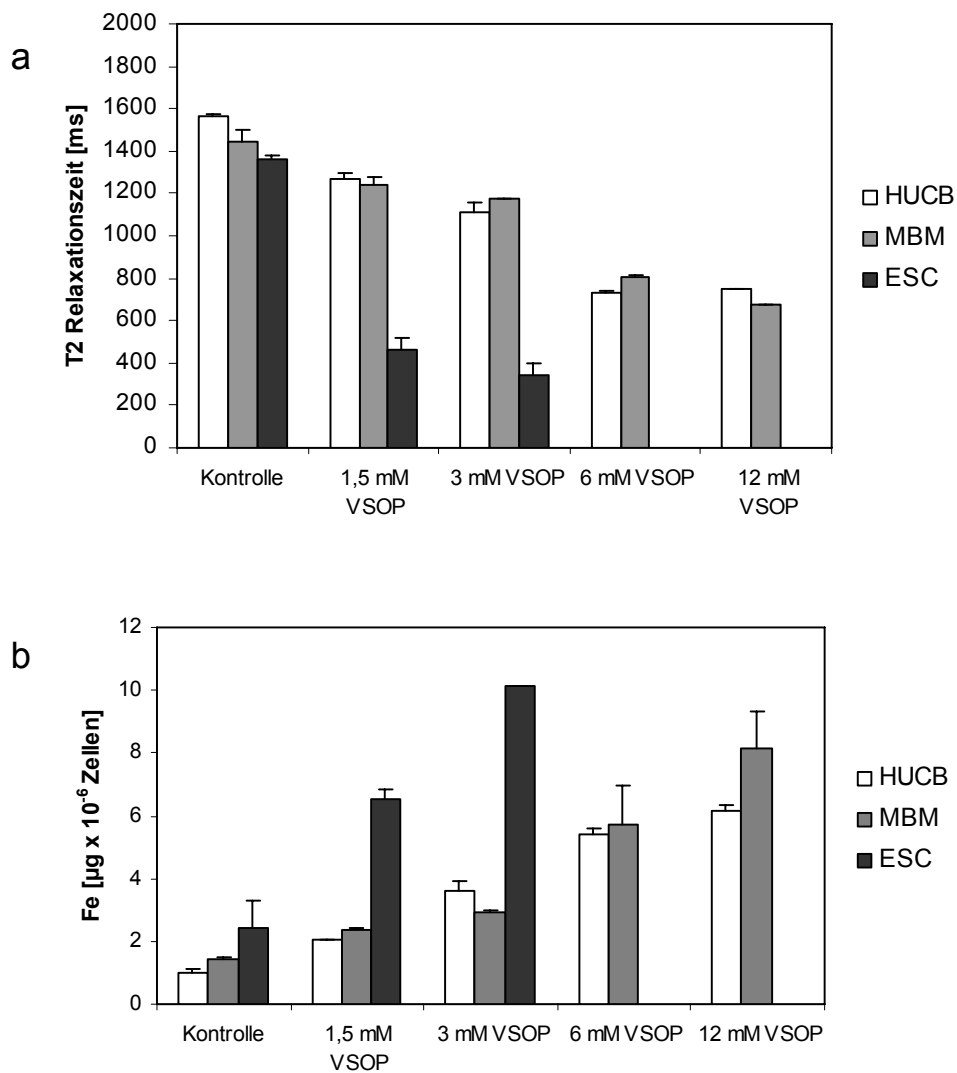


Abbildung 5: Messungen der T2-Relaxationszeiten (a) bzw. der aufgenommenen Eisenmenge (b) einer Zellsuspension von jeweils $0,6 \times 10^6$ muriner embryonaler Stammzellen (ESC), humaner Nabelschnurblutzellen (HUCB) sowie Knochenmarkszellen der Ratte (MBM). Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Eisenoxidnanopartikels VSOP C200 für 90 Minuten inkubiert. Die Messung der T2-Relaxationszeit erfolgte mittels NMR-Relaxometrie (a), die Messung der aufgenommenen Eisenmenge erfolgte mittels Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) (b), hier wurden die Eisenmengen auf 1×10^6 Zellen normiert.

Bei der Messung der Menge an aufgenommenem Eisen durch Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) zeigt sich eine signifikante konzentrationsabhängige Eisenaufnahme durch die embryonalen Stammzellen (Abb. 5 b). Die mononukleären Zellen aus dem Knochenmark (MBM) bzw. aus der Nabelschnur (HUCB) zeigen hingegen eine geringere Eisenaufnahme. Ein Vergleich der Messungen der transversalen Relaxationszeit mittels NMR-Relaxometrie mit der direkten Messung des intrazellulären Eisens mittels AAS legt einen inversen Zusammenhang nahe.

Mit immortalisierten Makrophagen der Ratte (RAW) wurden identische Markierungsversuche durchgeführt, die Aufnahmecharakteristik ist mit derer embryonaler Stammzellen vergleichbar.

Zur Messung der Stabilität der magnetischen Markierung wurden Versuche mit Makrophagen der Ratte durchgeführt, da diese unter *in vitro* Bedingungen ein stabileres Proliferationsverhalten zeigen.

In Abbildung 6 sind die T2-Relaxationszeiten magnetisch markierter Makrophagen über einen Zeitraum von vier Tagen dargestellt. An Tag 0 erfolgte die magnetische Markierung von jeweils $0,6 \times 10^5$ Makrophagen. Nach der magnetischen Markierung wurden die Zellen wieder in Medium überführt und im Brutschrank weiter kultiviert, lediglich die Proben für den Tag 0 wurden sofort gemessen.

In den darauf folgenden Tagen wurde jeweils die gesamte Zellpopulation mittels NMR-Relaxometrie untersucht. Es zeigte sich, dass trotz Proliferation der Zellen (siehe Abschnitt Proliferationsassays) die T2-Relaxationszeit nicht ansteigt. dies weist darauf hin, dass die absolute Menge an aufgenommenen Eisenoxidnanopartikeln in der gesamten Zellpopulation trotz Zunahme der Zellzahl nahezu gleich bleibt.

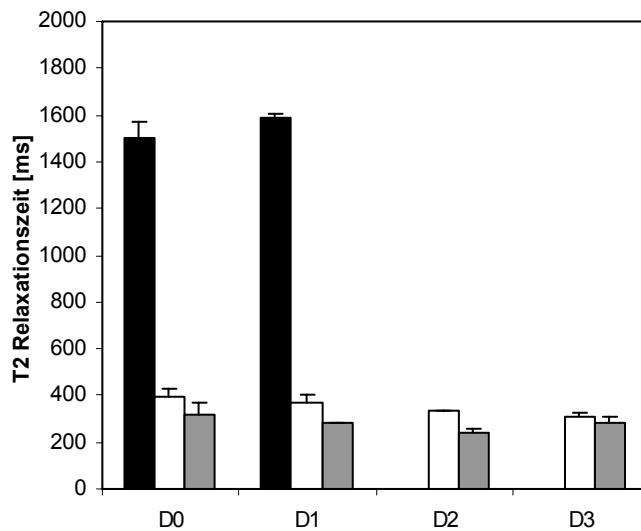


Abbildung 6: Stabilität der zellulären magnetischen Markierung. Schwarze Balken stellen die Relaxationszeiten der Kontrolle (unmarkierter Makrophagen) dar. Weiße bzw. graue Balken zeigen Relaxationszeiten von Zellsuspensionen magnetisch markierter Makrophagen (weiß 1,5 mM VSOP, grau 3 mM VSOP Inkubationskonzentration). Die Einheit der x-Achse sind Tage. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier unabhängigen Ansätzen pro Versuchstag und Konzentration dargestellt.

3.2 Einfluss von Lipofektionsagenzien und Inkubationszeiten auf die intrazelluläre Aufnahme von Eisenoxidnanopartikeln

Um eine optimale magnetische Markierung muriner embryonaler Stammzellen zu erreichen, denen im Rahmen dieser Studie die größte Bedeutung zukommt, wurde der Einfluss der Inkubationszeit auf die Menge an aufgenommenen Eisenoxidnanopartikeln untersucht. Des weiteren legten Studien anderer Arbeitsgruppen die Möglichkeit der weiteren Erhöhung der Partikelinkorporation durch die Verwendung von Lipofektionsreagenzien nahe [25, 53].

Die zelluläre Eisenaufnahme wurde in Übereinstimmung mit den obigen Untersuchungen sowohl indirekt durch NMR-Relaxometrie als auch direkt durch Atom-Absorptionsspektroskopie (AAS) bestimmt. Die Zellen wurden 1,5, 4 bzw. 24 h mit 1,5 mM VSOP inkubiert. Die Inkubationskonzentration von 1,5 mM hat hinsichtlich zellulärer Viabilität als am besten geeignet herausgestellt (siehe Abschnitt Vitalitätstests).

Die Lipofektion ist eine Methode zur Einschleusung von DNA, RNA und anderer Partikel in eukaryotische Zellen mithilfe von Liposomen. Dabei kommt es zur Bildung

eines lipophilen Komplexes aus Liposomen und Partikeln, der gesamte Komplex wird von der Zelle durch Endozytose aufgenommen. Zur Formation dieser Komplexe wurden die Eisenoxidnanopartikel 30 Minuten mit 6 μ l der Transfektionsreagenz FuGENE (Roche) coininkubiert. Anschließend erfolgt die Inkubation dieses Liposomen-Eisen-Komplexes mit den Stammzellen für 90 Minuten, 4 oder 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂.

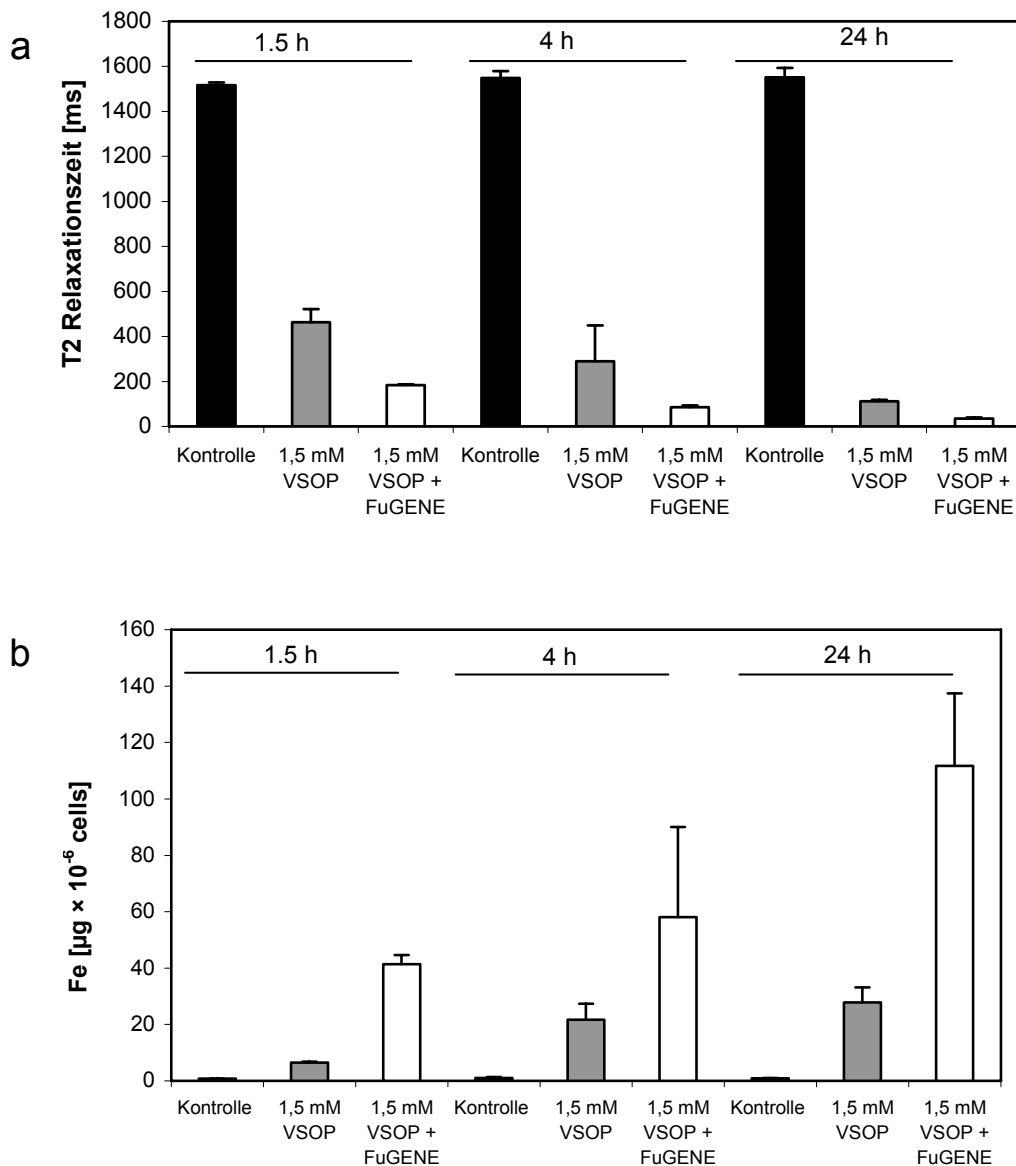


Abbildung 7: Abhängigkeit der intrazellulären Aufnahme des Eisenoxidnanopartikels VSOP C200 von der Inkubationszeit und der Coinkubation mit dem Lipofektionsagens FuGENE. $0,6 \times 10^6$ murine embryonale Stammzellen wurden für 1,5, 4 bzw. 24 h mit 1,5 mM VSOP oder mit 1,5 mM VSOP und 6 μ l FuGENE inkubiert. a) Messung der transversalen Relaxationszeit (T2-Zeit) mittels NMR-Relaxometrie. b) Messung der aufgenommenen Eisenmenge durch Atom-Absorptionsspektroskopie, normiert auf 1×10^6 Zellen.

In Abbildung 7 stellt sich eine signifikant höhere Eisenaufnahme bei Verwendung des Liposomen-VSOP-Komplexes im Vergleich zur Inkubation mit VSOP allein dar. Besonders deutlich wird dies bei der Inkubationszeit von 1,5 h, hier konnte eine Erhöhung der aufgenommenen Eisenmenge von 6,5 auf 41,3 $\mu\text{g} / 1 \times 10^6$ Zellen erreicht werden, dies entspricht einer über sechsfachen Erhöhung. Die inverse Proportionalität zwischen der Reduktion der T2-Zeiten und der aufgenommenen Eisenmenge konnte erneut bestätigt werden.

Weiterhin stellt sich eine signifikante Abhängigkeit der Eisenaufnahme – sei es nach Inkubation mit VSOP allein oder mit dem Liposomen-VSOP-Komplex – von der Inkubationszeit dar. Nach 24 h Inkubation ergaben sich für VSOP allein bzw. VSOP-FuGENE Werte von 27,8 bzw. 111,7 $\mu\text{g Fe} / 1 \times 10^6$ Zellen.

Neben der Quantifizierung der intrazellulären Eisenmenge wurden Vitalitätsassays durchgeführt (siehe unten), außerdem wurde die Morphologie der Stammzellen lichtmikroskopisch untersucht.

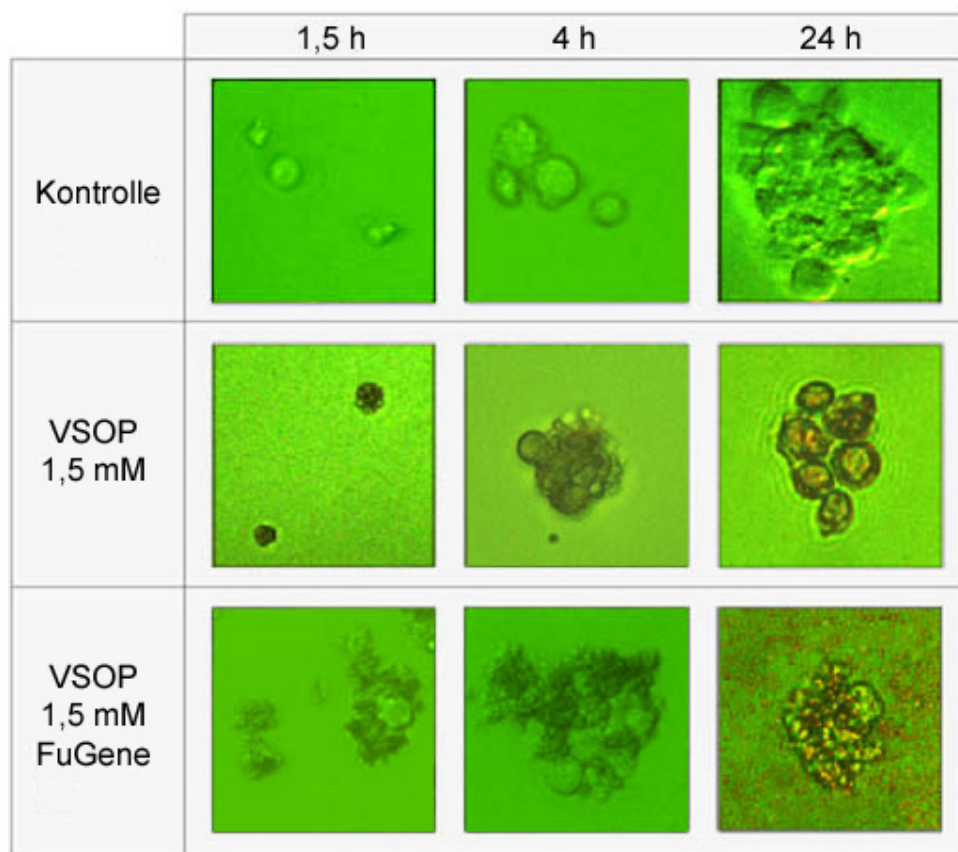


Abbildung 8: Lichtmikroskopische Aufnahmen (100 \times) muriner embryonaler Stammzellen. Es sind unmarkierte (Kontrolle), mit VSOP inkubierte und mit VSOP-FuGene inkubierte Stammzellen bei drei Inkubationszeiten dargestellt.

In Abbildung 8 stellen sich die unmarkierten Zellen morphologisch normal dar, es kommt nach 24 h zur Bildung von Embryoidkörperchen (embryoid bodies, EB), da im Inkubationsmedium die Differenzierungshemmer depletiert wurden. Nach Inkubation mit Eisenoxidnanopartikeln allein zeigt sich bereits nach 1,5 h eine homogene bräunliche Färbung der Zellen. Die Morphologie der Zellen ist unauffällig. Die Erhöhung der Inkubationszeit führt zu keiner weiteren signifikanten Veränderung der zellulären Morphologie und Färbung.

Nach Inkubation mit den VSOP-FuGENE-Komplexen stellt sich ein gänzlich anderes Bild dar. Nach 1,5 h Inkubation sind die Liposomen deutlich sichtbar, sie scheinen sich an die Zellmembranen der Stammzellen zu adhären. Die Färbung der Zellen stellt sich heterogen dar. Nach 4 h Inkubation finden sich deutlich mehr adhären Liposomen. Ein besonderes Bild bietet sich 24 h nach Inkubation, es zeigen sich die Liposomen rasenartig am Boden der Petrischale. Auch fällt eine heterogene Färbung der embryonalen Stammzellen auf, weiterhin stellen sich Aggregate von zellulär adhären Liposomen dar. Auch durch wiederholtes Waschen mit PBS und der Erhöhung der Umdrehungszahl bei der Zentrifugation auf für die Zellen maximal tolerable 1500 UPM konnte keine signifikante Reduktion der liposomalen Aggregate erreicht werden.

3.3 Modellierung des Zusammenhanges der Reduktion der T2-Zeiten von der Erhöhung der intrazellulären Eisenmenge

Es konnte bei allen Markierungsversuchen ein Zusammenhang zwischen der Reduktion der T2-Zeit und der intrazellulären Eisenmenge festgestellt werden. Diese inverse Proportionalität wurde mittels einer Regressionsanalyse (SPSS) quantifiziert. Die Aufnahmecharakteristika dreier Zelllinien wurden untersucht: muriner embryonaler Stammzellen (ESC), Knochenmarkszellen der Ratte (MBM) sowie humaner Nabelschnurblutzellen (HUCB). Es zeigte sich bei allen drei Regressionsanalysen eine Korrelation nahe -1, somit liegt eine inverse Korrelation zwischen der Eisenaufnahme und der Reduktion der T2-Zeit vor. Dies beantwortet jedoch noch nicht die Frage nach der Art der Korrelation. Der Angabe von Relaxivitäten für Kontrastmittel in der Literatur liegt ein linearer Zusammenhang zwischen Eisenmenge T2-Zeit zugrunde [21]. Der lineare Fit ergab in allen drei Fällen quadratische Korrelationskoeffizienten zwischen 0,87 und 0,96. Eine exponentielle

Korrelation zeigt jedoch in allen drei Fällen einen nahezu ideale Kurvenanpassung mit Korrelationskoeffizienten nahe 1. Es ergeben sich Exponentialfunktionen mit den Parametern T2 [ms] und F [µM Fe] (Tabelle 2). Eine gleiche Menge an aufgenommenem Eisenoxid führt bei jedem Zelltyp zu unterschiedlichen T2-Zeiten.

Tabelle 2: Zellspezifischer Zusammenhang zwischen T2-Zeiten und absoluten Eisenmengen

Zelltyp/Partikel	Korrelation	R2lin fit	R2exp fit	Gleichung
MBM	-0,980*	0,961	0,987	$T2 = e^{-10,5 \times F} + 1643 \text{ ms}$
HUCB	-0,982*	0,964	0,965	$T2 = e^{-13,9 \times F} + 1793 \text{ ms}$
ESC	-0,932	0,869	0,928	$T2 = e^{-16,7 \times F} + 1895 \text{ ms}$

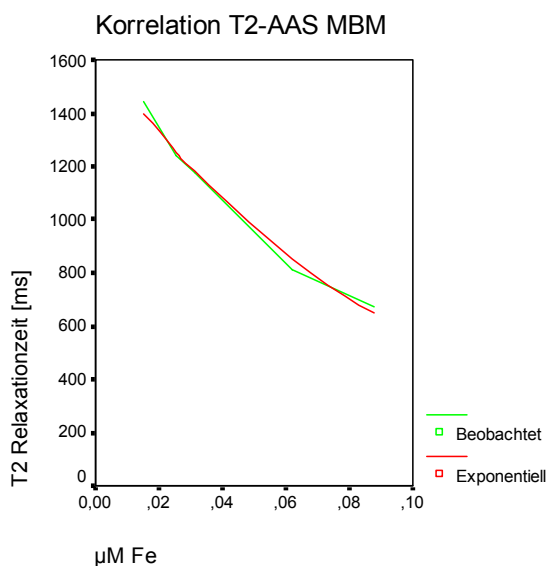
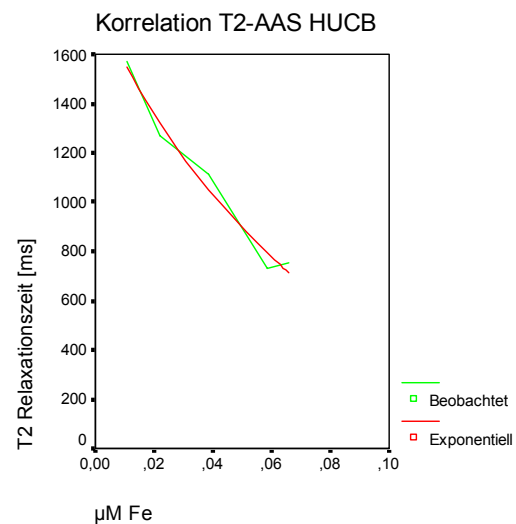
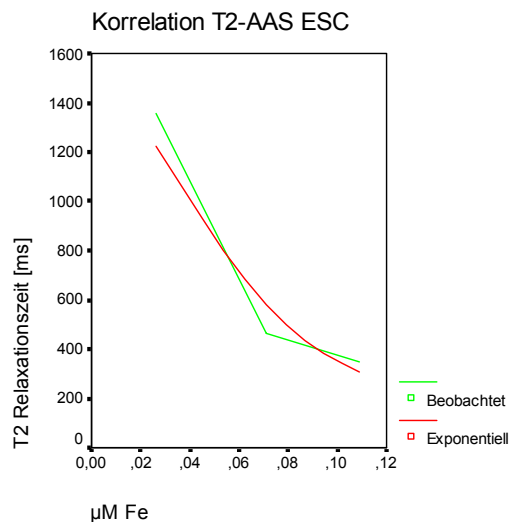


Abbildung. 9: Exponentielle Kurvenanpassung der Abhängigkeit der T2-Zeit von der Menge an aufgenommenem Eisen. Die exponentielle Korrelation ist nur in $\mu\text{M-Fe}$ Bereich möglich. Eine Modellierung der Abhängigkeit bis in den Bereich von Eisenmengen diagnostisch applizierter Dosen (mM Fe) war nicht möglich.

3.4 Intrazelluläre Lokalisation des fluoreszenzmarkierten

Eisenoxidnanopartikels VSOP C200

Zur Bestimmung der intrazellulären Lokalisation der Eisenoxidnanopartikel wurden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-Grün markiert und mit embryonalen Stammzellen *in vitro* inkubiert. Mittels Confocaler Laser Scanning Mikroskopie wurden zwei Fluoreszenzkanäle simultan aufgenommen.

Im Überblick (Abb. 10 a) stellen sich 10 adhärente embryonale Stammzellen dar. Die Überlagerung von grünen (RhD-VSOP) und rotem (ANEPPS) Intensitäten ergibt ein gelbes Summensignal im Falle einer Kolo-kalisation. In der linken mittigen Bildhälfte schneidet die Focusebene eine Stammzelle in der Mitte. Die intrazelluläre Lokalisation des RhD-VSOP-Signals wird hier deutlich. Es findet sich darüber hinaus eine homogene Aufnahme der RhD-VSOP in der gesamten beobachteten Zellpopulation, bei allen Zellen zeigte sich je nach Focusebene entweder ein gelbes Summensignal oder eine hohe Signalintensität im grünen Frequenzbereich. Zur Visualisierung der intrazellulären Kompartimentierung ist in Abb. 10 b-d eine einzelne embryonale Stammzelle dargestellt, die Focusebene schneidet die Zelle in der Mitte. Im roten Kanal, dominiert durch die Fluoreszenz des Membranfarbstoffes ANEPPS, stellen sich die Zellmembran, die nukleäre Membran, sowie eine Vielzahl von Vesikelmembranen dar (Abb. 10 b). Im grünen Kanal zeigen sich isolierte Aggregate hoher Signalintensität. Das Summensignal zeigt, dass eine Kolo-kalisation nur im Bereich der Vesikel vorliegt. Das Zytoplasma sowie die nukleäre und zelluläre Membran zeigen keine grüne Signalintensität.

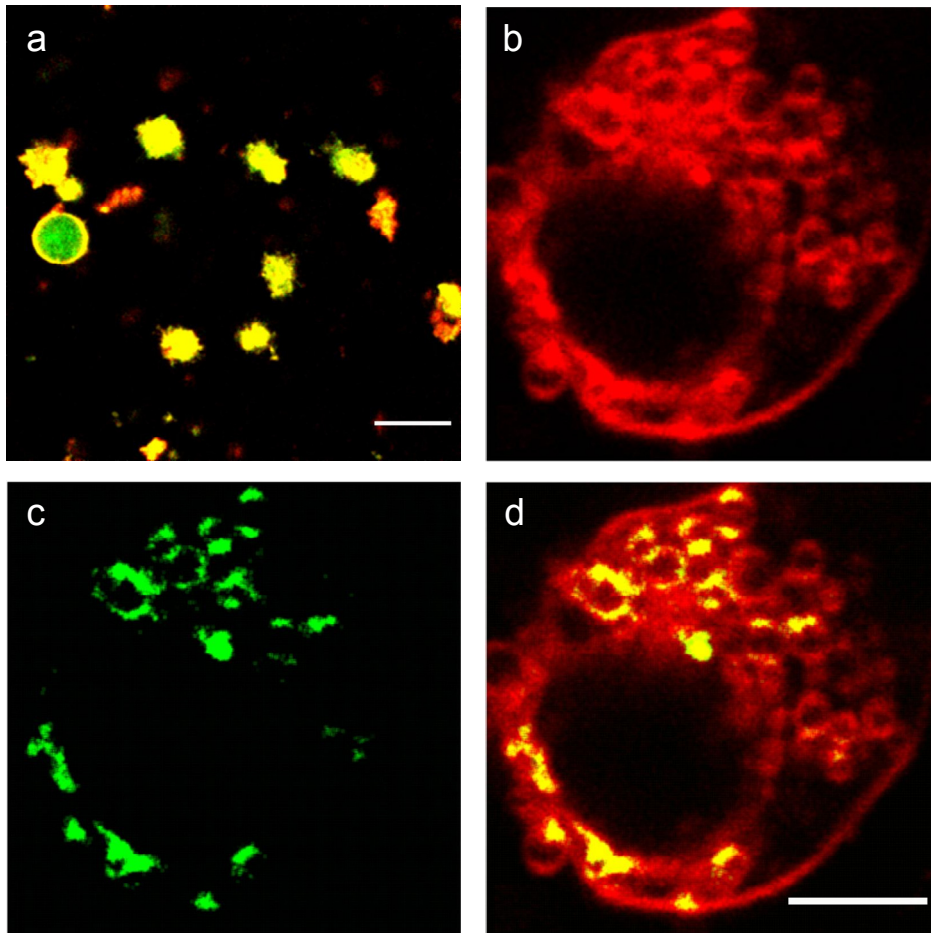


Abbildung 10: Confokale Fluoreszenzaufnahmen embryonaler Stammzellen nach Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Eisenoxidpartikeln. Zwei Fluoreszenzkanäle wurden simultan aufgenommen. Der grüne Kanal (510-560 nm) beinhaltet das Emissionsmaximum der Rhodamin-Grün-VSOP-Partikel. Der rote Kanal (610-670 nm) beinhaltet das Emissionsmaximum des Membranmarkers ANEPPS. Bild a zeigt einen Überblick über eine Gruppe von adhärenz Stammzellen, beide Kanäle wurden überlagert. Der Maßstab sind 20 μm . Die Bilder b-d zeigen eine einzelne embryonale Stammzelle, der Maßstab sind 5 μm . Bilder b und c zeigen den grünen bzw. roten Kanal, Bild d die Überlagerung beider Kanäle.

3.5 Magnetische Markierung von Zellen als Vitalitätsmarker in vitro und in vivo

Die obigen Untersuchungen zeigen, dass die T2-Zeit und damit der kernspintomographische Bildkontrast nicht nur abhängig ist von der Menge an aufgenommenem Eisen, sondern auch vom Zelltyp und somit der räumlichen Verteilung, Aggregation und Mikroumgebung der Eisenoxidnanopartikel. Dies schien die Möglichkeit zu eröffnen, vitale und lysierte Zellen nichtinvasiv anhand ihrer magnetischen Eigenschaften zu unterscheiden. Dazu wurden magnetisch markierte

Makrophagen der Ratte (RAW) durch Zugabe von 1 M NaCl lysiert. Die Lyse der Zellen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert, es fanden sich nach Inkubation mit 1 M NaCl lediglich Membranfragmente, nahezu keine intakten Zellen. Die Zellsuspension wurde nun vor und nach der Lyse mittels NMR-Relaxometrie untersucht. Es ergeben sich signifikante Unterschiede in den T2-Zeiten, die Lyse der Zellen zieht eine signifikante Reduktion der T2-Zeit nach sich (Abb. 11 a).

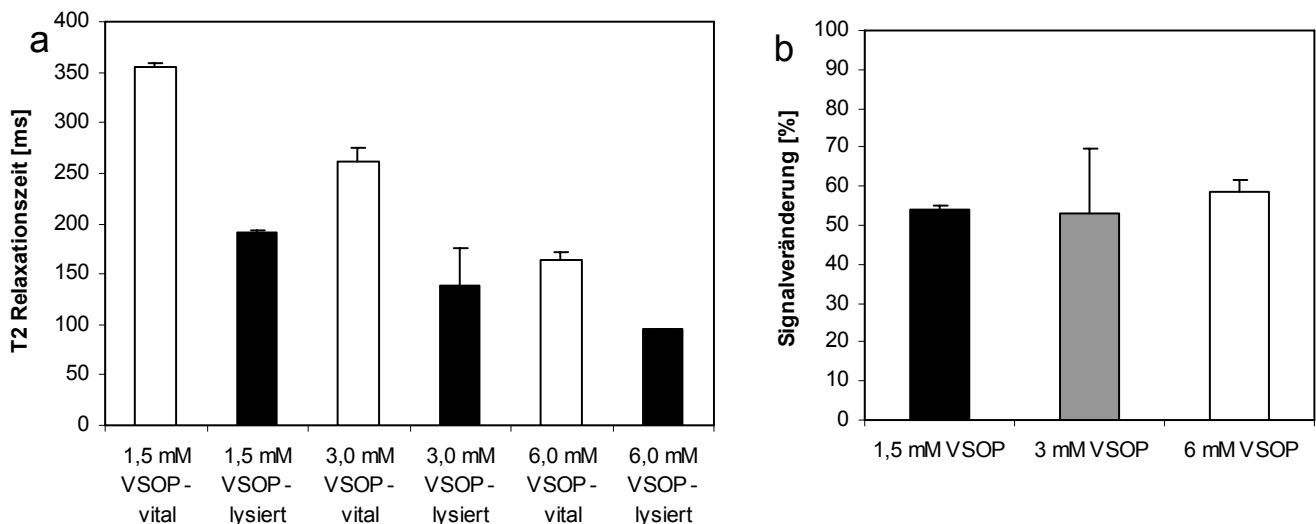


Abbildung 11: a) Messung der T2 Relaxationszeit von Makrophagen der Ratte (Zelllinie RAW; $0,8 \times 10^6$ Zellen pro Ansatz). Zellen wurden nach der Inkubation mit VSOP C200 für 90 min entweder vital oder lysiert gemessen. Zellyse durch osmotischen Schock wurde durch Zugabe von 1M NaCl induziert. b) Prozentuale Änderung der T2-Relaxationszeiten magnetisch markierter Makrophagen nach Lyse der Zellen bei verschiedenen VSOP Konzentrationen.

Die Reduktion der T2-Zeiten nach der Lyse der Zellen zeigte sich nicht abhängig von der VSOP-Konzentration während der Inkubation (1,5; 3 oder 6 mM). Die Reduktion der T2-Zeiten beträgt bei allen Inkubationskonzentrationen ca. 50 % (Abb. 11 b).

Zur Übertragung der *in vitro* Untersuchungen auf die *in vivo* Situation war es nötig, kernspintomographische Bildgebungssequenzen zu etablieren, die eine räumlich aufgelöste Quantifizierung der charakteristischen Zeitkonstante der transversalen Relaxation (T2-Zeit) erlauben. Konventionelle T2-gewichtete Sequenzen erlauben diese Quantifizierung nicht. Anhand von Gelphantomen, in die schichtweise magnetisch markierte Zellen aus dem Knochenmark eingebracht wurden, konnten T2-gewichtete Multiechosequenzen evaluiert werden (Abb. 12). Dabei wurde bei 8 verschiedenen Echozeiten, beginnend bei der minimalen Echozeit von 3 ms

kernspintomographische Bildgebung durchgeführt. Die jeweilige Signalintensität jedes Voxels lässt sich durch $S = S_0 * e^{-\frac{t}{T_2}}$ approximieren. Durch monoexponentielle Kurvenanpassung an die experimentellen Signalintensitäten kann ein Parameterbild der absoluten T2-Zeiten berechnet werden (Abb. 12 b).

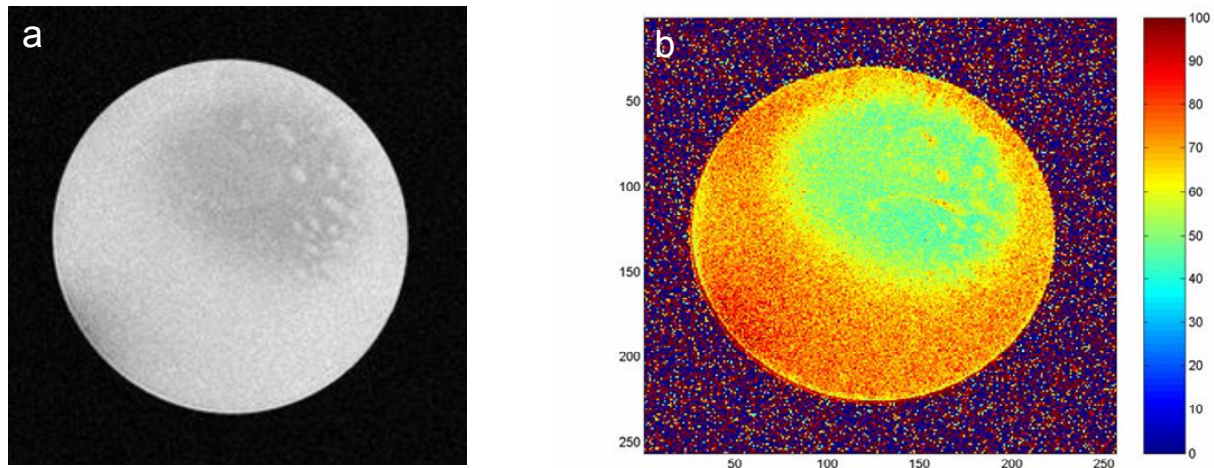


Abbildung 12: a) T2-gewichtete axiale MR-Aufnahme bei 7T. Schichtphantom mit 10.000 Zellen aus dem Knochenmark, magnetisch markiert mit 1,5 mM VSOP, eingebettet in 100 µl Gelmatrix. Räumliche Auflösung 137×137×600 µm.

b) T2-Karte berechnet durch monoexponentielle Anpassung von T2-gewichteten Multiechoaufnahmen mit 8 Echos (Matlab).

In der single-echo Turbospinaufnahme stellen sich die magnetisch markierten Stammzellen als hypointenses Areal dar (Abb. 12 a). Dieses Areal korrespondiert zu Bereichen geringer T2-Zeiten im Parameterbild. Ein Vergleich vitaler und lysierter Zellen vergleichbar zu der NMR-Relaxometrie *in vitro* ließ sich in den Gelphantome nicht verwirklichen, da die Zellen das Einbetten in die heiße Gelmatrix nicht überlebten.

Der nächste Schritt zur nicht-invasiven Detektion der Vitalität transplanteder Zellen bestand in der Akquirierung der T2-Karten im Rahmen der Studie zur Detektion embryonaler Stammzellen im Parkinson-Modell der Ratte (siehe unten). Neben T2- und T2*-gewichteten Sequenzen wurden die oben dargelegten T2-Multiechosequenzen bei nahezu jeder kernspintomographischen Untersuchung gemessen. Abbildung 13 zeigt axiale *in vivo* T2-Karten nach monoexponentieller Kurvenanpassung eine bzw. acht Wochen nach der Transplantation. Es finden sich

Bereiche niedriger T2-Zeiten im Bereich des Stichkanals. Diese korrespondieren zu den Signalauslöschungen in der T2*-gewichteten morphologischen Bildgebung (siehe unten). Im Vergleich der Zeitpunkte zeigt sich 8 Wochen nach der Transplantation (Abb. 13 b) ein signifikant reduzierter Bereich niedriger T2-Zeiten. Jedoch konnte keine ausreichende räumliche Auflösung realisiert werden, um weitergehende Aussagen zu treffen. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis von Multi-Echosequenzen ist signifikant geringer verglichen mit single-echo Turbospinechosequenzen, da die Repetitionszeit TR sehr groß gewählt werden muss, und somit eine geringere Zahl an Mittellungen möglich ist.

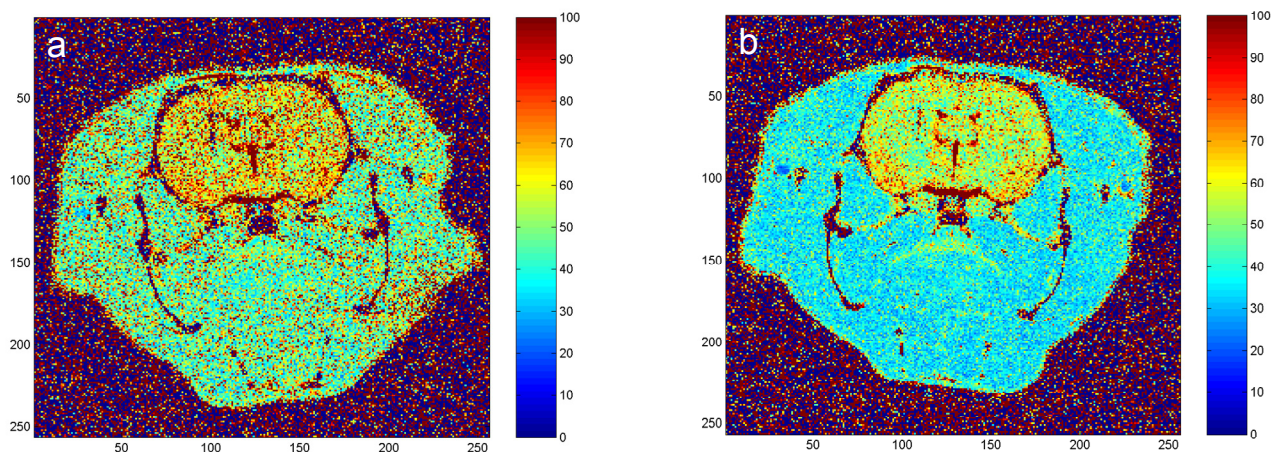


Abbildung 13: T2 Karten in vivo nach der Transplantation von 100.000 magnetisch markierten embryonalen Stammzellen in das Striatum von 6-OHDA-läsionierten Ratten. T2-Karten berechnet durch monoexponentielle Anpassung von T2-gewichteten Multiechoaufnahmen mit 8 Echos (Matlab). a) Eine Woche nach Transplantation, b) 8 Wochen nach Transplantation. Räumliche Auflösung $137 \times 137 \times 600 \mu\text{m}$.

3.6 Vitalitäts- und Proliferationsassays

Untersuchungen zu möglichen Einflüssen der magnetischen Markierung auf die Biologie der Zellen wurden bei allen magnetisch markierten Zellen durchgeführt. Es seien hier drei Ansätze der Vitalitätsbestimmung an verschiedenen Zellpopulationen vorgestellt.

Primäre fötale Mittelhirnzellen der Ratte wurden direkt nach der Präparation mit 8 mM VSOP inkubiert, dies entspricht mehr als der doppelten Dosis, die für eine effiziente magnetische Markierung ausreicht (siehe Abb. 4). 24 h nach der Inkubation wurden die inzwischen adhärennten Zellen mit den fluoreszierenden Vitalitätsmarkern Akridin-

Orange und Ethidium-Bromid inkubiert. Bei dieser Färbung stellen sich vitale Zellen grün fluoreszierend dar, tote Zellen stellen sich durch die Interkalierung des roten Fluoreszenzfarbstoffes mit der zellulären DNA, der nur durch eine ruptierte Zellmembran in den Nukleus diffundieren kann, rot dar. Zwischen den unbehandelten und VSOP-markierten Zellen zeigen sich nach visueller Inspektion keine Unterschiede (Abb. 14). Auch die zelluläre Morphologie der unreifen Neuronen und Glia stellte sich normal dar.

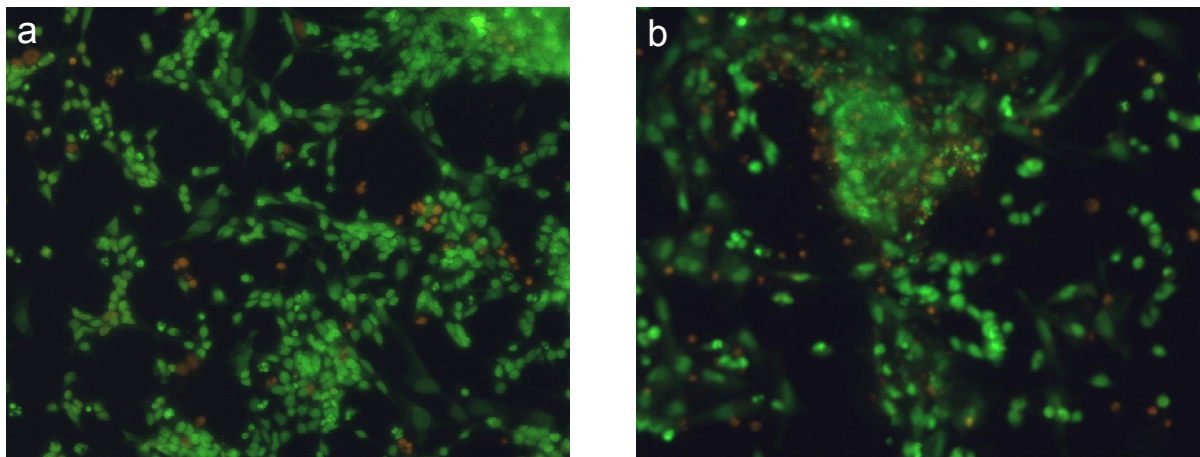


Abbildung 14: a) Vitalitätsfärbung unmarkierter embryonaler Mittelhirnzellen (Kontrolle). b) Vitalitätsfärbung embryonaler Mittelhirnzellen 24h nach Inkubation mit 8 mM VSOP C200 für 90 min. Inkubation mit den Fluoreszenzmarkern Akridin-Orange und Ethidiumbromid. Fluoreszenzmikroskopie (100x)

Eine Quantifizierung der Vitalitätsrate ist durch den Trypanblautest möglich. Drei Zellpopulationen wurden mit unterschiedlichen VSOP-Konzentrationen für 90 Minuten inkubiert. Humane Nabelschnurblutzellen (HUCB) und Knochenmarkszellen der Ratte (MBM) zeigten bis zur höchsten Inkubationskonzentration von 12 mM, die wie oben dargestellt hinsichtlich der Eisenaufnahme bereits im Bereich der Sättigung liegt, keine signifikante Reduktion der Vitalitätsrate (Abb. 15). Embryonale Stammzellen hingegen zeigen einen konzentrationsabhängigen Abfall der Vitalität, die unmarkierten Zellen sind zu 93 % vital, nach Inkubation mit 1,5 mM zu 90 % und nach Inkubation mit 3 mM VSOP zu 87 % (Abb. 15; schwarze Balken).

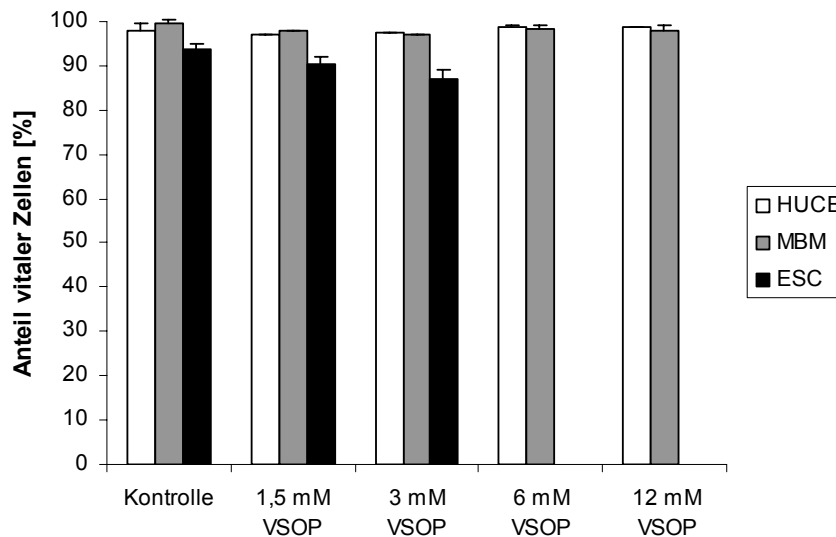


Abbildung 15: Vitalitätsbestimmung dreier Zellpopulationen mittels Trypanblautest: humaner Nabelschnurzellen (HUCB), Knochenmarkszellen der Ratte (MBM) sowie muriner embryonaler Stammzellen (ESC). Zellen wurden mithilfe einer Neubauer Zählkammer quantifiziert, tote Zellen erscheinen durch das Eindringen des Trypans in die Zelle blau.

Die Untersuchungen zu einem möglichen Einfluss der magnetischen Markierung auf die zelluläre Proliferationsrate wurden an Makrophagen der Ratte (RAW) durchgeführt, da diese als immortalisierte Zellen ein stabiles Proliferationsverhalten zeigen. Die Zellen wurden mit 1,5 mM VSOP markiert und über einen Zeitraum von 4 Tagen wurde die Anzahl der vitalen Zellen bestimmt. Die Proliferationsrate wurde mittels der Anpassung einer exponentiellen Wachstumskurve an die experimentellen

Daten modelliert um diese zu skalieren: $n = n_0 \cdot e^{k \cdot t} \Leftrightarrow k = \frac{\ln(n) - \ln(n_0)}{t}$. Für die Kontrollzellen und für die mit 1,5 mM VSOP magnetisch markierten Zellen ergeben sich die folgenden, nahezu identischen Wachstumskonstanten: $k_k = 1.06 \pm 0.11$ [1/d] bzw. $k_{1,5} = 1.07 \pm 0.10$ [1/d].

Wie in Abbildung 16 visualisiert ergeben sich keine Unterschiede zwischen markierten und unmarkierten Zellen hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens.

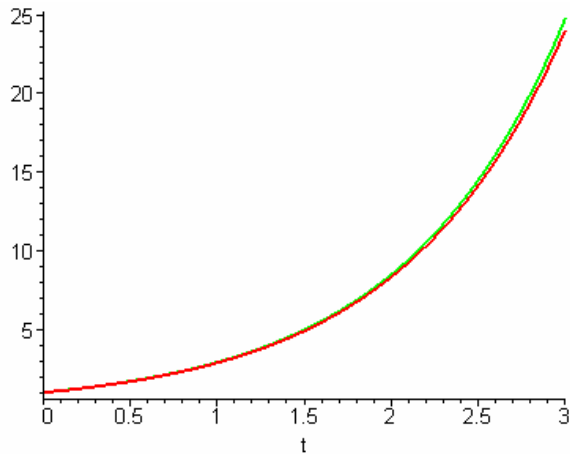


Abbildung 16: Proliferationskurven magnetisch markierter (grün) bzw. unmarkierter Makrophagen in den ersten drei Tagen nach der Inkubation. Die Einheiten der y-Achse stellen die normierten Zellzahlen dar, die Einheiten der x-Achse sind Tage.

3.7 Untersuchungen zum oxidativen Stress in vitro

Zur Bestimmung der oxidativen Belastungen der Zelle nach Inkubation mit Eisenoxidpartikeln wurden die Konzentrationen des Markers der Lipidperoxidation, Malondialdehyd und den Produkten der Proteinoxidation, Proteincarbonylen, mittels HPLC bestimmt. Die Konzentration von Malondialdehyd (MDA) steigt unmittelbar nach Ende der Inkubation von RAW-Zellen mit Eisenoxidnanopartikeln signifikant an (Abb. 17, weiße Balken). Proteincarbonyle zeigen die gleiche Tendenz, auch wenn aufgrund der großen Streuung der Messwerte keine Signifikanz festgestellt werden konnte. Der Anstieg der MDA-Konzentration ist abhängig von der VSOP-Konzentration während der Inkubation. Um festzustellen, ob es sich um einen permanenten Anstieg oder nur um einen transienten Effekt handelt, wurden zusätzlich die MDA-Konzentrationen 24 h nach Inkubation bestimmt (Abb. 17, graue Balken). Es zeigte sich eine Reduktion des oxidativen Stresses der magnetisch markierten Zellen auf Kontrollniveau.

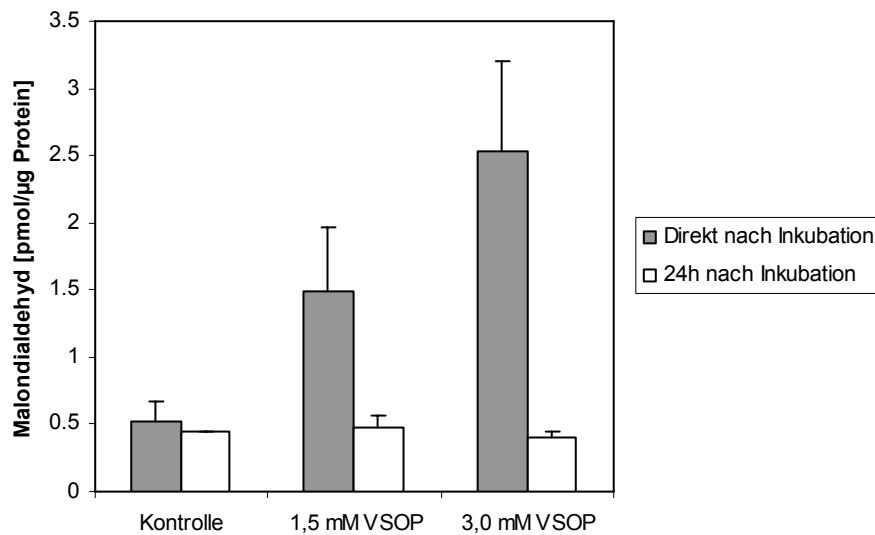


Abbildung 17: Messung der Malondialdehydkonzentration direkt bzw. 24 h nach der Inkubation von Makrophagen (RAW) mit Eisenoxidnanopartikeln.

Um festzustellen, ob freies intrazelluläres Eisenoxid die transiente Erhöhung des oxidativen Stress verursacht, wurde während der Inkubation das Antioxidanz PBN und der Eisenchelator Desferal zugesetzt. Beide Substanzen vermögen die gesteigerte oxidative Belastung auf Kontrollniveau zu senken (Abb. 18).

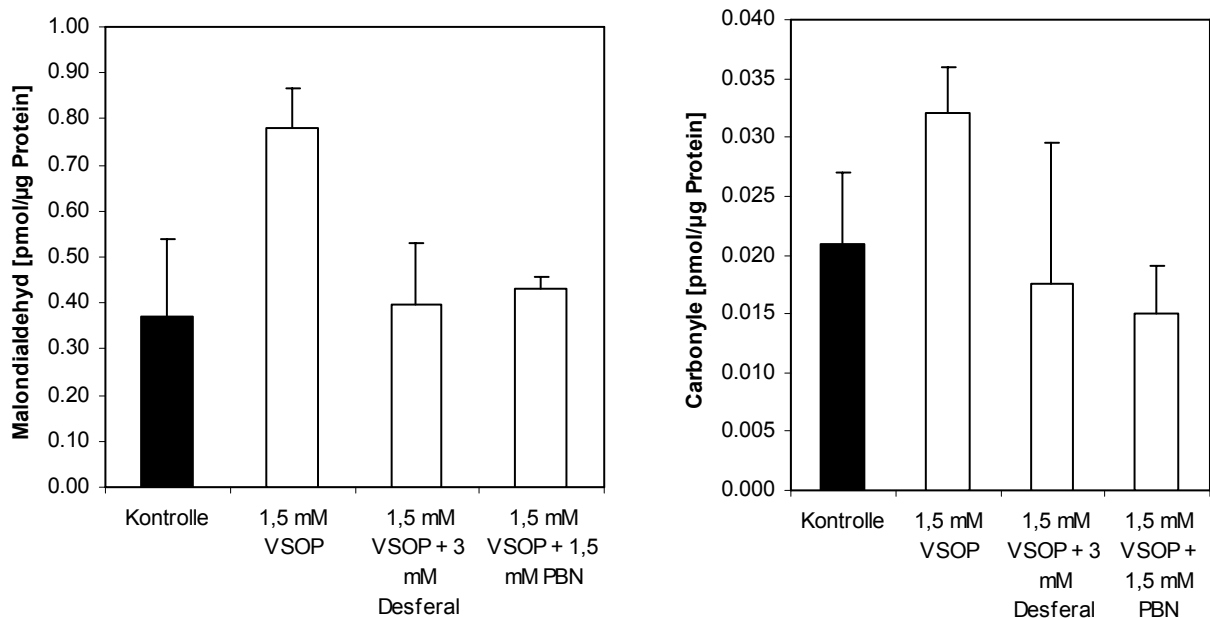


Abbildung 18: Applikation von Anti-Oxidantien während der Inkubation von Makrophagen mit Eisenoxidnanopartikeln.

3.8 Einfluss der magnetischen Markierung auf die

Differenzierungsfähigkeit embryonaler Stammzellen

Um eine Beeinträchtigung der Differenzierungsfähigkeit embryonaler Stammzellen auszuschließen, wurden diese mit 1,5 bzw. 3 mM VSOP für 90 Minuten inkubiert und anschließend in normalem Stammzellmedium weiter kultiviert. Als Indikator für die Totipotenz diente der Nachweis des Stammzellantigens surface specific embryonic antigen 1 (SSEA 1) durch Immunfluoreszenz. Direkt nach der Inkubation und an den darauf folgenden zwei Tagen wurde der Anteil der SSEA positiven Zellen mittels FACS-Analyse quantifiziert. Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss der magnetischen Markierung auf den Anteil der undifferenzierten Stammzellen (Abb. 19).

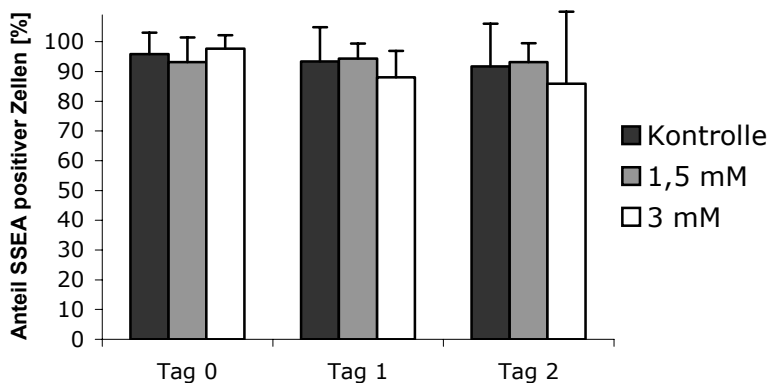


Abbildung 19: FACS-Messungen muriner embryonaler Stammzellen nach Inkubation mit VSOP. Undifferenzierte Zellen tragen das Oberflächenantigen SSEA1. Mittels eines Antikörpers gegen SSEA1 und einem fluoreszierenden Sekundärantikörper konnte der Anteil fluoreszierender und somit undifferenzierter Zellen bestimmt werden.

Neben der Frage einer ungewollten Induktion der Differenzierung ist auch die Frage zu klären, ob die Eisenoxidnanopartikel einen Einfluss auf eine gerichtete Differenzierung nehmen, die durch die Applikation von Wachstumsfaktoren und die Depletion von Differenzierungshemmern erreicht wird. Embryonale Stammzellen lassen sich per definitionem in alle Körperzellen exklusive der Keimzellen differenzieren. Naturgemäß können nicht alle Differenzierungswege untersucht werden. Hier wurde die Differenzierung zu neuronalen Vorläuferzellen untersucht, da

sie in der stammzellbasierten Therapie neuronaler ZNS-Krankheiten die größte Rolle spielen.

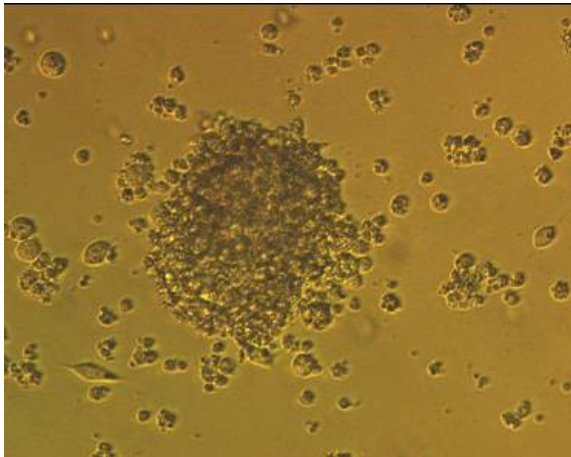


Abbildung 20: Murine embryonale Stammzellen in der ersten Phase der Differenzierung, in der Bildmitte ist ein embrioid-Körper (embryoid body, EB) zu sehen. Durchlichtmikroskopie 100 ×.

Mittels Immunfluoreszenz wurden wie oben methodisch bereits dargelegt die Anzahl der Zellen quantifiziert, die sich in einem bestimmten Differenzierungsstadium befinden. Es wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Anteil der Intermediärfilamente Nestin und β -3-Tubulin bestimmt. Zusätzlich wurde der Anteil der dopaminergen Neuronen durch Nachweis des für die Dopaminsynthese spezifischen Enzyms Tyrosinhydroxylase bestimmt, um Einflüsse auf die Neurogenese ausschließen zu können. Es fanden sich keine signifikanten quantitativen Unterschiede zwischen markierten und unmarkierten Zellen. Abbildung 21 zeigt die mikroskopische Darstellung von Zellaggregaten unterschiedlicher Differenzierungsstadien in Überlagerung von Durchlicht und antigenspezifischer Fluoreszenz. Auch bei visueller Inspektion stellt sich die zelluläre Morphologie markierter Zellen normal dar.

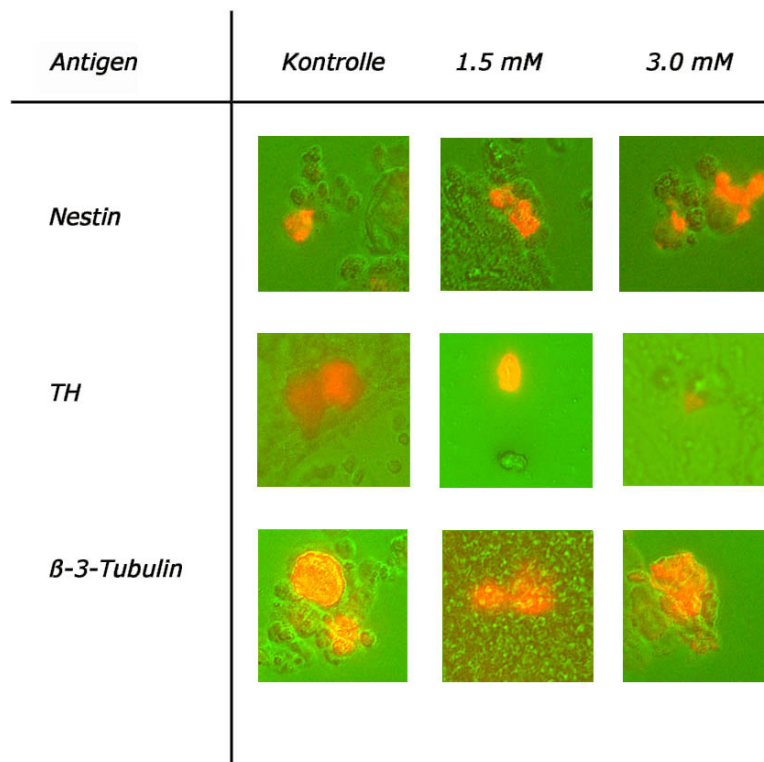


Abbildung 21. Überlagerung durchlicht- und fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen vordifferenzierter embryonaler Stammzellen. Die Stammzellen wurden im undifferenzierten Stadium magnetisch markiert und anschließend nach Protokollen von Lee et al. [35] in die Richtung dopaminerger Neuronen differenziert.

4 Detektionslimit magnetisch markierter embryonaler

Stammzellen *in vitro* und *in vivo* – MR-Tomographie bei 1,5 T, 7 T und 17,6 T

Fragestellung

Die Ermittlung des Detektionslimits magnetisch markierter Zellen ist von großer Wichtigkeit hinsichtlich der Grenzen der zellulären Kernspintomographie. Ein Nachweis von einigen 10.000 Zellen mag für die reine Lokalisation des Transplantats zum Beispiel bei der *direkten* intracerebralen Zelltransplantation bei Morbus Parkinson ausreichend sein. Geht es jedoch um Fragen der Migration von Zellen oder soll eine Anreicherung von Zellen nach *systemischer* Injektion visualisiert werden, wie hier später folgend am Beispiel der cerebralen Ischämie, so sind wenige hundert Zellen spezifisch zu erkennen. Gerade bei einer systemischen Injektion ist der Ort des Eintritts der Zellen in das Hirnparenchym aus dem vaskulären System nicht bekannt. Neben einer maximalen Sensitivität muss somit auch eine hohe Spezifität gewahrt bleiben. Eisenoxidmarkierte Zellen verursachen keine direkte Signaländerung, sie sind nur durch mittelbare Effekte auf die Phasenkohärenz der umgebenden Wasserprotonen sowie durch ihr lokales Magnetfeld zu detektieren. Dies ist insbesondere bei der Verwendung von T2*-gewichteten Sequenzen von entscheidender Bedeutung, da diese Sequenzen neben ihrer hohen Sensitivität für eisenoxidmarkierte Zellen auch eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Bildartefakten besitzen. Darüber hinaus stellt sich die Frage, inwieweit das Detektionslimit magnetisch markierter Zellen von der Feldstärke des Kernspintomographen abhängt. Dies ist insbesondere im Hinblick auf die klinische Anwendung der Methodik von Wichtigkeit. In diesem Problemkreis wurden die folgenden Fragen beantwortet:

- Ist eine T2*-gewichtete Bildgebungssequenz auch bei Höchstfeldstärken für die Visualisierung von eisenoxidmarkierten Zellen am besten geeignet?
- Wieviele Zellen lassen sich nach Einbettung in eine Gelmatrix kernspintomographisch visualisieren?
- Kann eine spezifische Detektion eisenoxid-markierter Stammzellen nach intrastriateller Injektion bei 17,6 T erreicht werden?
- In welchem Bereich liegt die Nachweisbarkeitsgrenze embryonaler Stammzellen bei 17,6 T *in vivo*?

- Inwieweit ist das Detektionslimit magnetisch markierter Zellen feldstärkenabhängig?
- Lassen sich die kernspintomographischen Signaländerungen histologisch mit eisenoxid-markierten Zellen korrelieren?

4.1 Kernspintomographische Bildgebung VSOP-markierter Zellen in einer Gelmatrix

Zur *in vitro* Visualisierung eisenoxidmarkierter Zellen wurden diese auf zwei unterschiedlichen Wegen in die Gelmatrix eingebracht. Zum einen wurden sie direkt in das Gel injiziert (Injektionsphantom). Dies simuliert eine direkte intrazerebrale Injektion. Zum anderen wurden die Zellen mit dem Gel vermischt, somit entstanden Gelphantome mit Schichten unterschiedlicher Zellzahl (Schichtphantom). Diese Phantome simulieren eine Anreicherung von Zellen nach systemischer Injektion.

Die Injektionsgele wurden bei einer Feldstärke von 17,6 T kernspintomographisch untersucht, die Schichtgele bei 7 T.

In Übereinstimmung mit dem *in vivo* Transplantationsprotokoll wurden 2 µl einer NaCl-Suspension mit VSOP-markierten embryonalen Stammzellen in unterschiedlichen Zellzahlen in ein Agarosegel injiziert. Pro Gel wurden vier Injektionen durchgeführt. In T2*-gewichteter Bildgebung stellt sich die Gelmatrix homogen und frei von Luftblasen dar. Die Injektionskanäle können durch den etwas helleren Bildkontrast im Vergleich zum Gel identifiziert werden. Abbildung 22 zeigt longitudinale Schnittebenen durch die Injektionskanäle. Die markierten Stammzellen stellen sich als Signalauslöschungen dar. Bei der Injektion von 500 Zellen / µl sind ausgedehnte hypointense Bereiche im gesamten Bereich des Stichkanals zu sehen (Abb. 22 b). Die Injektion von 50 Zellen / µl hingegen führt zu räumlich separierten Signalauslöschungen geringerer Intensität (Abb. 22 c). Unmarkierte Zellen zeigen keine signifikanten Hypointensitäten (Abb. 22 a).

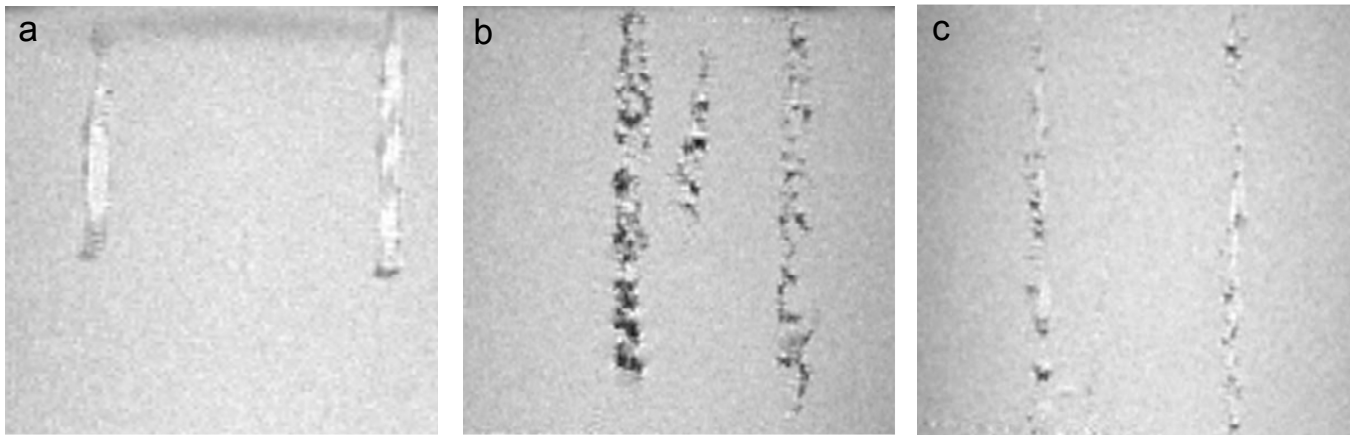


Abbildung 22: T2*-gewichtete MR-Aufnahmen bei 17,6 T von Gelphantomen mit injizierten magnetisch markierten embryonalen Stammzellen. ESC wurden in 2 μ l NaCl injiziert. a) Injektion von 1000 unmarkierten Stammzellen. Zwei Injektionskanäle sind als hyperintense Bereiche zu sehen. b) Injektion von 1000 magnetisch markierten Stammzellen. Drei Injektionskanäle sind zu sehen. Die Zellen sind als hypointense Areale visualisiert. c) Injektion von 100 magnetisch markierten Stammzellen. Aggregate von 10 oder weniger Zellen sind deutlich abzugrenzen. Die räumliche Auflösung beträgt 98 μ m.

Die Schichtgele stellen sich in der T2*-gewichteten Bildgebung bei 7 T ebenfalls homogen und luftblasenfrei dar. Schichten unmarkierter Zellen zeigen keinen Kontrast, lediglich die Grenzschichten der Gele verursachen vereinzelte Suszeptibilitätsartefakte. Schichten mit im Gel gelösten magnetisch markierten Zellen zeigen in der axialen Schnitfführung (Abb. 23 a) deutliche hypointense Signalveränderungen. Diese stellen sich im Vergleich zu den Injektionsgelen jedoch weitgehend homogen dar. Die Zellen verteilen sich auf einer Fläche von ca. 1 cm², die Dicke der Zellschichten beträgt weniger als 1 mm. Auch 1000 Zellen sind deutlich abzugrenzen, 100 Zellen zeigen lediglich in der axialen Schichtführung kleinere hypointense Signalveränderungen, eine sichere Abgrenzung von Grenzflächenartefakten ist jedoch nicht möglich. Im Vergleich zum Injektionsgel kann jedoch von einer wesentlich geringeren lokalen Zelldichte ausgegangen werden.

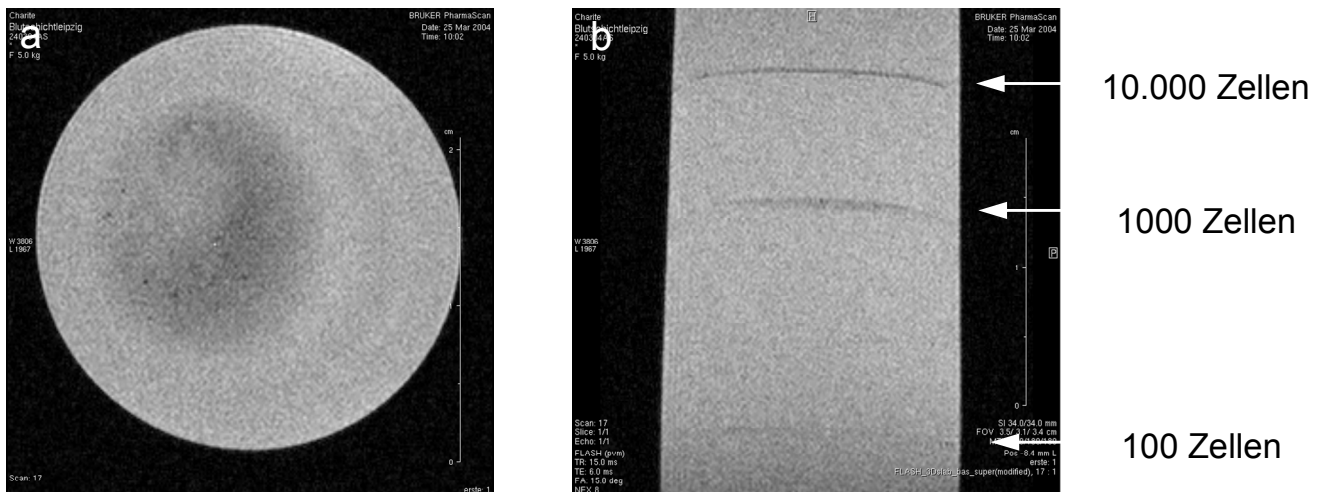


Abbildung 23: T2*-gewichtete Aufnahmen bei 7 T von einem Schichtphantom. Es wurden drei Schichten von 10.000, 1000 und 100 humanen mononukleären Zellen aus der Nabelschnur (HUCB) in das Gel eingebracht. Die Zellen wurden mit 6 mM VSOP magnetisch markiert und in jeweils 100 µl Gel gelöst. a) Axiale Aufnahme der obersten Schicht mit 10.000 Zellen. b) Sagittale Aufnahme, alle drei Zellschichten sind zu sehen. Die Auflösung beträgt bei beiden Schnittebenen 194 x 172 x 189 µm.

4.2 Detektionslimit von magnetisch markierten embryonalen

Stammzellen bei 17,6 Tesla in vivo

Zur Bestimmung der minimalen Anzahl an Zellen, die mittels Kernspintomographie im Höchstfeld zu erfassen sind, wurden sowohl magnetisch markierte als auch unmarkierte embryonale Stammzellen in das Striatum von insgesamt 17 weiblichen Wistar Ratten transplantiert. Der intrinsische Bildkontrast der T2*-gewichteten 3D-Flash Sequenz erlaubte die Unterscheidung zwischen grauer und weißer Substanz sowie die Darstellung des Corpus Callosum, des Fornix sowie der anterioren Kommissur. Darüber hinaus konnten Teile der Ventrikel sowie Gefäße identifiziert werden. Der Bildkontrast der Gefäße war in großem Maße abhängig von der Richtung des Blutflusses im Verhältnis zur Bildgebungsebene. 120.000 magnetisch markierte embryonale Stammzellen stellten sich nach der intrastriatalen Injektion kernspintomographisch als ausgedehnte Hypointensitäten dar (Abb. 24). Diese verteilten sich über einen großen Teil der linken Hemisphäre. Neben dem Injektionskanal fanden sich Hypointensitäten hauptsächlich entlang des linken Ventrikels. In der contralateralen Hemisphäre sind keine Signaländerungen festzustellen. Bei der erneuten kernspintomographischen Untersuchung drei Tage nach der Injektion lassen sich hinsichtlich der räumlichen Verteilung der Hypointensitäten nur minimale Unterschiede feststellen. Die Signalauslöschungen

entlang des Injektionskanals zeigten sich weniger stark ausgeprägt, jedoch stellte sich eine etwas ausgedehntere Verteilung entlang des linken Ventrikels dar. Zusätzlich fanden sich Hypointensitäten im linken Teil des dritten Ventrikels. Über die nächsten 22 Tage ergaben sich keine signifikanten Veränderungen in der räumlichen Verteilung der Zellen.

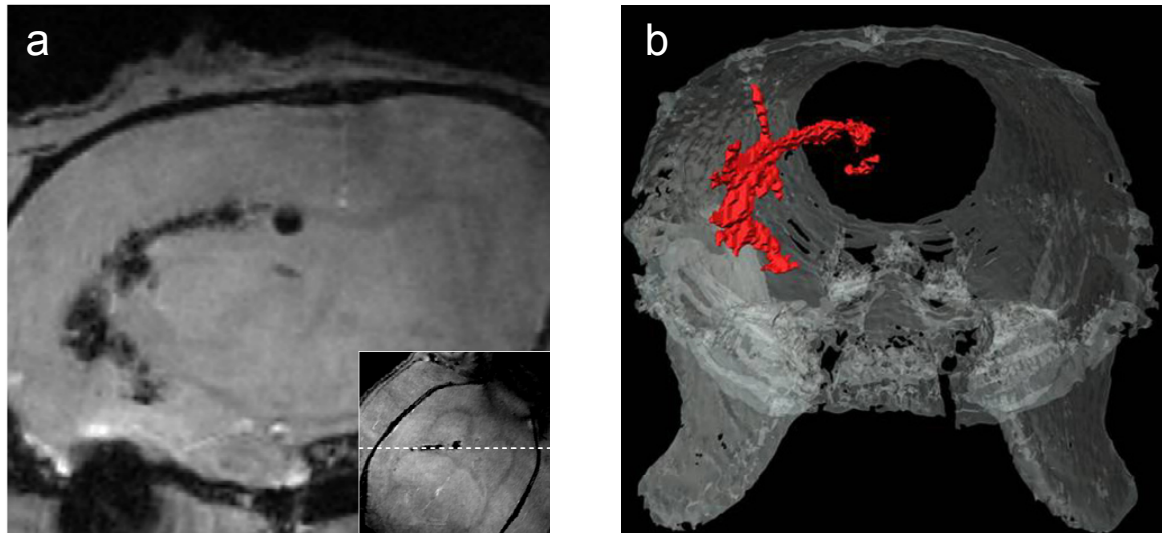


Abbildung 24: a) T2* gewichtete MR Aufnahme bei 17,6 T nach Injektion von 120.000 magnetisch markierten embryonalen Stammzellen. b) Die 3D-Rekonstruktion der Hypointensitäten (rot) zeigt die Verteilung der Zellen im Injektionskanal und im Ventrikel. Die räumliche Auflösung beträgt 98 µm.

Nach der intrastriatalen Transplantation von 1000 magnetisch markierten Zellen zeigte sich bei allen drei transplantierten Tieren im Bereich des Injektionskanals eine deutlich ausgeprägte Signalauslöschung (Abb. 25 a). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Transplantation von unmarkierten Stammzellen keine vergleichbare Signaländerung in den sechs transplantierten Tieren (Abb. 25 c). Nichtsdestotrotz zeigten sich bei zwei dieser Kontrolltiere Signaländerungen im oberen Teil des Injektionskanals. Diese konnten histologisch einer Mikroblutung zugeordnet werden. Transplantation von 100 Zellen führte zu kleineren Signalauslöschungen, die sich jedoch noch immer über mehrere 3D Schichten erstreckten (Abb. 25 b). Nach der Transplantation von 20 Zellen zeigten sich nur kleiner Signalauslöschungen. Eine eindeutige Zuordnung der Hypointensitäten zu den markierten Zellen konnte nicht erreicht werden, da Infiltration der Cerebrospinalflüssigkeit oder Mikroblutungen als Ursache der Signaländerungen nicht ausgeschlossen werden konnten.

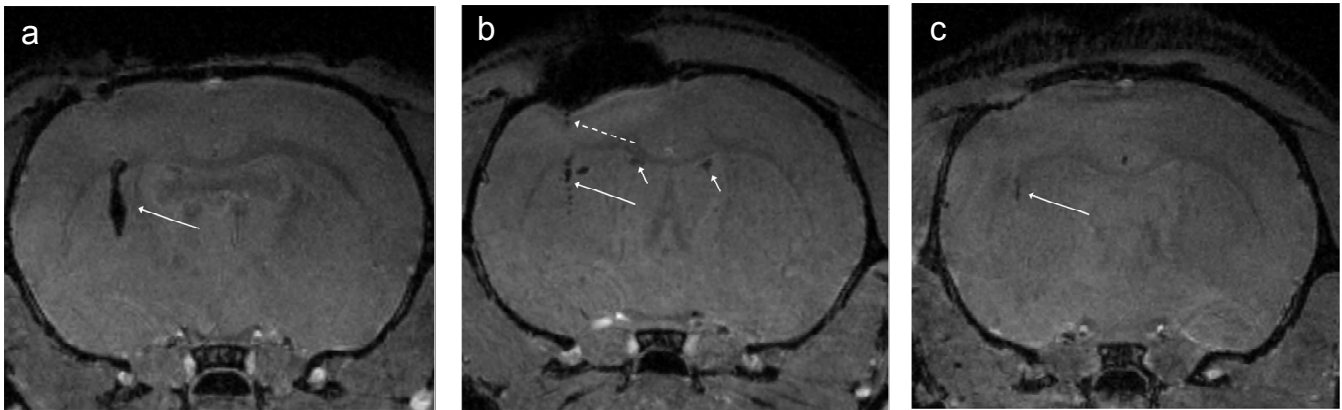


Abbildung 25: T2*-gewichtete MR-Aufnahmen bei 17,6 T in vivo nach intrastriateller Injektion von a) 1000, b) 100 magnetisch markierten bzw. c) 1000 unmarkierten Stammzellen. Die magnetisch markierten Zellen sind deutlich als abgegrenzte Hypointensitäten sichtbar. Unmarkierte Zellen verursachen nur leichte Signaländerungen. In b) sind die lateralen Ventrikel als Signalauslöschungen abzugrenzen (kurze Pfeile).

Eine absolute Quantifizierung der T2*-Zeit der hypointensen Bereiche war nicht möglich, da nach der kürzesten realisierbaren Echozeit von 3,0 ms das MR-Signal bereits im Bereich des Rauschens lag. Somit kann keine quantitative Abhängigkeit der Reduktion der T2*-Zeit von der Anzahl der transplantierten Zellen berechnet werden. Durch die Quantifizierung der hypointensen Voxel konnte jedoch ein empirischer Zusammenhang hergestellt werden. Es zeigte sich eine Größenzunahme des hypointensen Areals sowohl bei der Erhöhung der Zahl der transplantierten Zellen als auch bei der Verlängerung der Echozeit. Nach der Transplantation von 100 Zellen fanden sich Signalauslöschungen in 183 ± 86 (3,0 ms Echozeit) bzw. 204 ± 132 Voxel (4,6 ms Echozeit). Die Transplantation von 1000 Zellen führte zu 492 ± 135 (3,0 ms) bzw. 654 ± 86 (4,6 ms) hypointensen Voxel. Diese empirische Quantifizierung zeigt, dass bei einer Erhöhung der Zellzahl um den Faktor 10 der T2* Effekt um etwa den Faktor drei zunimmt. Die große Standardabweichung begründet sich in der großen interindividuellen Variabilität durch eine heterogene lokale Zelldichte.

4.3 Histologische Korrelation und Quantifizierung

In der Histologie konnte nach genauer Prüfung der seriellen coronalen Schnitte in allen transplantierten Tieren der Injektionskanal gefunden werden. Es zeigte sich eine kleine gliöse Narbe, teilweise verbunden mit einem zentralen Defekt. Die

Abbildungen 26 a - c zeigen coronale Schnitte eines Tieres, welches drei Wochen nach der Transplantation von 1000 magnetisch markierten Stammzellen transkardial perfundiert wurde. Der Stichkanal (Pfeil) verläuft beginnend vom parietalen Cortex durch den Corpus Callosum. Im Bereich der Basalganglien stellt sich eine Mikroblutung dar. Ähnliche Mikroblutungen fanden sich bei mehreren Tieren, inklusive der zwei Kontrolltiere mit homogenen Signalauslöschungen in der kernspintomographischen Bildgebung. Bei Tieren denen 20 oder 100 Zellen transplantiert wurden fanden sich nur vereinzelte Berliner Blau oder SSEA positive Zellen. Nach der Transplantation von 1000 Zellen fanden sich jedoch eine große Anzahl von Berliner Blau positiven Zellen im unteren Bereich des Stichkanals. Abbildung 26 b zeigt die quantitative histologische Evaluierung Berliner Blau positiver Zellen aus insgesamt 14 seriellen Schnitten. Die räumliche Verteilung der insgesamt 832 Stammzellen im Stichkanal oder in der unmittelbaren Umgebung ist schematisch dargestellt. Eine größere Anzahl Stammzellen fand sich in den unmittelbar benachbarten Bahnen des Corpus Callosum. Abbildung 26 d zeigt einen coronalen Schnitt mit einer Dicke von 25 µm eines Tieres welches direkt nach der Transplantation von 1000 Stammzellen und der MRT-Untersuchung getötet wurde. Es konnten in diesem Schnitt insgesamt 60 SSEA positive Zellen bestimmt werden. Die Quantifizierung der SSEA-positiven Zellen der 10 Schichten im Bereich des Transplantationskanals und der unmittelbaren Umgebung ergab insgesamt 746 Stammzellen. In anderen Bereichen des Gehirns wurden keine SSEA-positiven Zellen gefunden.

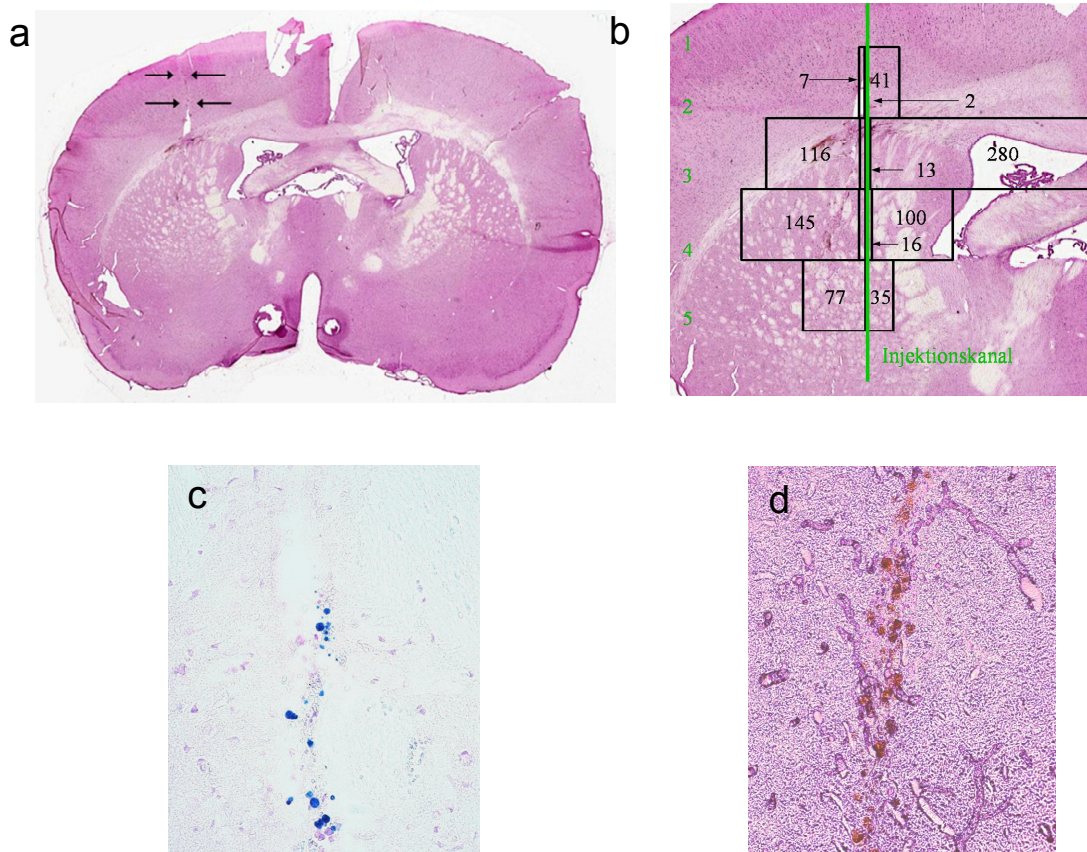


Abbildung 26: Histologische Untersuchung einer Ratte nach der intrastriatalen Injektion von 1000 magnetisch markierten Stammzellen. a) Übersichtsaufnahme in coronaler Schnittebene. Hämatoxylin / Eosin-Färbung. b) Schematische Abbildung der histologischen Quantifizierung Berliner-Blau-positiver Zellen. Insgesamt wurden 832 Zellen gefunden. c) Serieller Schnitt gefärbt mit Berliner Blau für den Nachweis von Eisen. d) Serieller Schnitt eines weiteren Tieres, ebenfalls nach Transplantation 1000 magnetisch markierter Stammzellen. Immunhistochemischer Nachweis des Stammzellmarkers SSEA1. Insgesamt 60 SSEA-positive Zellen konnten in diesem Schnitt nachgewiesen werden.

4.4 Abhängigkeit des Detektionslimits magnetisch markierter Zellen von der Feldstärke

Bei einer Erhöhung der Stärke des Hauptmagnetfeldes B_0 kommt es zu einer Erhöhung der Grundmagnetisierung, eine größere Anzahl von Protonen richten sich in Feldrichtung aus. Die kernspintomographische Signalstärke S steigt proportional im Quadrat an, $S \sim B_0^2$. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis verhält sich dazu direkt proportional, $SNR \sim B_0$. So kann durch das höhere Signal-zu-Rausch-Verhältnis bei höheren Feldstärken im Allgemeinen eine höhere Ortsauflösung realisiert werden.

Des weiteren steigt bei einer Erhöhung der Feldstärke jedoch auch die Leistung des Anregungspulses RF, da die Resonanzfrequenz steigt: $\omega_0 = \gamma B_0$, mit γ als dem gyromagnetischen Verhältnis und ω_0 als der Resonanzfrequenz. Daraus folgend kommt es bei schnellen Bildgebungssequenzen zur Problematik einer Überschreitung der SAR-Grenzwerte.

Zur Ortskodierung sind bei einer höheren Feldstärke stärkere Gradientenfelder nötig, die Empfindlichkeit gegenüber Magnetfeldinhomogenitäten steigt. Da eisenoxidmarkierte Zellen ebendiese Magnetfeldinhomogenitäten verursachen, ist von einer höheren Empfindlichkeit der Detektion bei höheren Feldstärken auszugehen, jedoch steigt parallel dazu die Artefaktanfälligkeit.

Zur Evaluierung der Auswirkungen dieser Abhängigkeiten auf das Detektionslimit magnetisch markierter Zellen wurde kernspintomographische Bildgebung an gesunden weiblichen Wistar-Ratten bei Feldstärken von 1,5 und 7 T durchgeführt. Des weiteren wurde untersucht, inwieweit sich unterschiedliche Stammzellpopulationen hinsichtlich ihrer kernspintomographischen Visualisierbarkeit unterscheiden.

Die kernspintomographische Bildgebung bei 1,5 T wurde an einem klinischen Scanner (Siemens Sonata) durchgeführt. Die Injektion von 50.000 magnetisch markierten embryonalen Stammzellen führte zu signifikanten Signalauslöschungen in der T2*-gewichteten Bildgebung (Abb. 27 a). Auch eine Injektion von 2000 Zellen führte noch zu signifikanten Signalauslöschungen (Abb. 27 b). Bei einer Injektion von unmarkierten Zellen kam es zu keinen vergleichbaren Signalauslöschungen, lediglich der Injektionskanal konnte vom umgebenden Hirnparenchym diskriminiert werden.

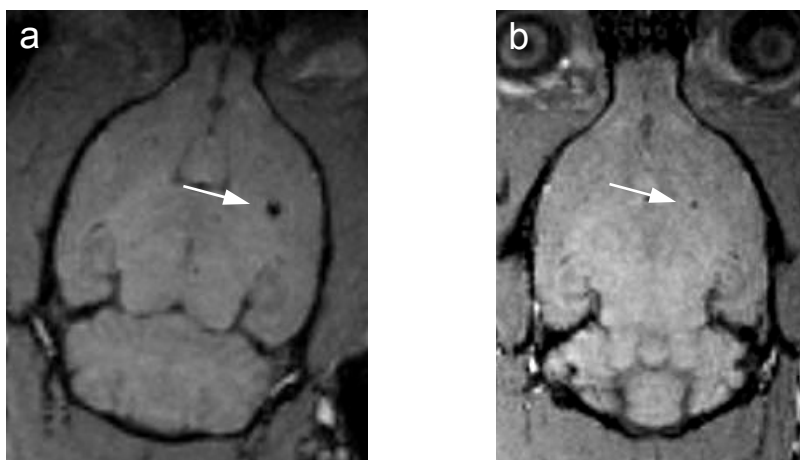


Abbildung 27: In vivo MRT 1h nach intrastriateller Injektion von a) 50.000 bzw. b) 2.000 magnetisch markierten embryonalen Stammzellen bei 1,5 T. Räumliche Auflösung 300×300×500 μm .

Die Bildgebung bei 7 T wurde an einem Kleintier-Kernspintomographen durchgeführt (Bruker Pharmascan). Im Vergleich zu klinischen Feldstärken stellten sich die T2*-gewichteten Bilder wesentlich kontrastreicher dar, anatomische Strukturen wie Ventrikel und der Corpus Callosum konnten deutlich vom Hirnparenchym abgegrenzt werden. Es konnte eine wesentlich größere räumliche Auflösung realisiert werden. Nach Transplantation von 10.000 magnetisch markierten embryonalen Stammzellen stellten sich deutliche Hypointensitäten im Bereich des Stichkanals dar. In Vorbereitung zur Langzeitstudie bei einem Rattenmodell des Morbus Parkinson (siehe unten), wurden die Tiere nach vier Monaten erneut kernspintomographisch untersucht. Neben Signalauslöschungen im Bereich des Stichkanals zeigte sich bei einem Tier deutliche Signalauslöschungen im Bereich des Corpus Callosum, räumlich direkt an den Stichkanal angrenzend (Abb. 28 a). Ca. 1,6 mm anterior konnte ein hypointenses Depot abgegrenzt werden (Abb. 28 b). In der Histologie konnten in räumlicher Korrelation Berliner-Blau-positive Zellen detektiert werden. Ein eindeutiger Nachweis, dass es sich bei diesen Zellen um die transplantierten magnetisch markierten embryonalen Stammzellen handelt, konnte jedoch nicht erbracht werden. Im Gegensatz zur späteren Parkinson-Studie waren die embryonalen Stammzellen nicht GFP-markiert.

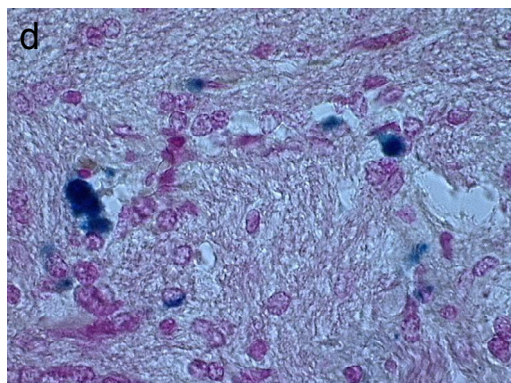
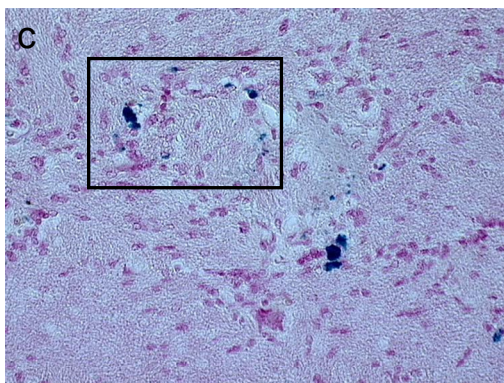
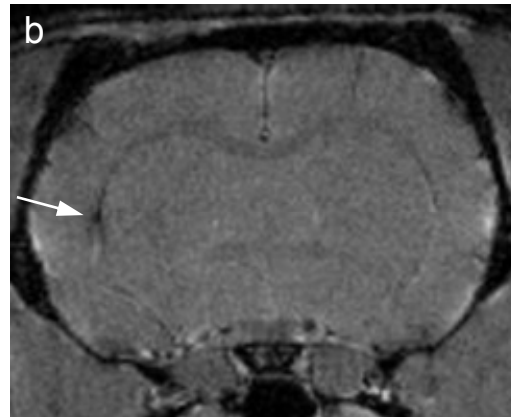
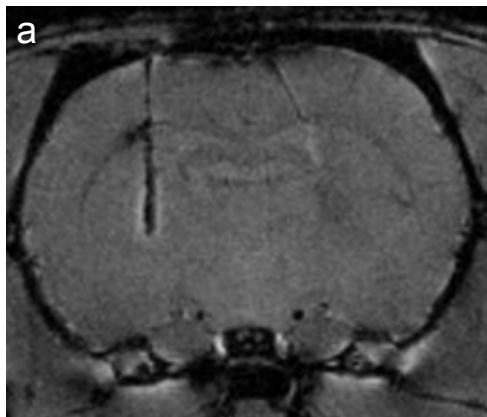


Abbildung 28: a), b), In vivo MRT bei 7 T 4 Monate nach der Transplantation von 10.000 magnetisch markierten embryonalen Stammzellen in das Striatum einer gesunden Ratte. Das Injektionsvolumen betrug 2 μ l, Zellen gelöst in NaCl. a) Schicht im Bereich des Injektionskanals. b) Schicht 1,6 mm anterior von a). Die räumliche Auflösung beträgt 117 \times 117 \times 400 μ m. c), d) Histologischer Schnitt im Bereich des Corpus Callosum in räumlicher Kolokalisation von b). HE und Berliner Blau Färbung. c) Übersichtsaufnahme (100 \times), d) Ausschnittsvergrößerung.

Neben embryonalen Stammzellen wurden auch mononukleäre Zellen aus der Nabelschnur (HUCB) und mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark der Ratte (MBM) intrastriatal injiziert, um Unterschiede in der kernspintomographischen Visualisierbarkeit zwischen den verschiedenen Zellpopulationen zu evaluieren.

Beide mononukleäre Zellpopulationen (HUCB und MBM) konnten in einer Zellzahl von 10.000 als ausgeprägte Hypointensität visualisiert werden (Abb. 29 b). Signifikante Unterschiede zwischen den drei Zellpopulationen (ESC, HUCB bzw. MBM) hinsichtlich der Ausdehnung der Hypointensitäten konnten nicht festgestellt werden, obgleich zu bemerken ist, dass zur vergleichbaren magnetischen Markierung der mononukleären Zellen wesentlich höhere VSOP-Inkubationskonzentrationen benötigt wurden (siehe oben).

Das kernspintomographische Detektionslimit aller drei Zellpopulationen liegt bei 7 T bei ca. 300 Zellen, in Abbildung 29 a stellen sich 500 magnetisch markierte mononukleäre Zellen als deutliches hypointenses Depot dar.

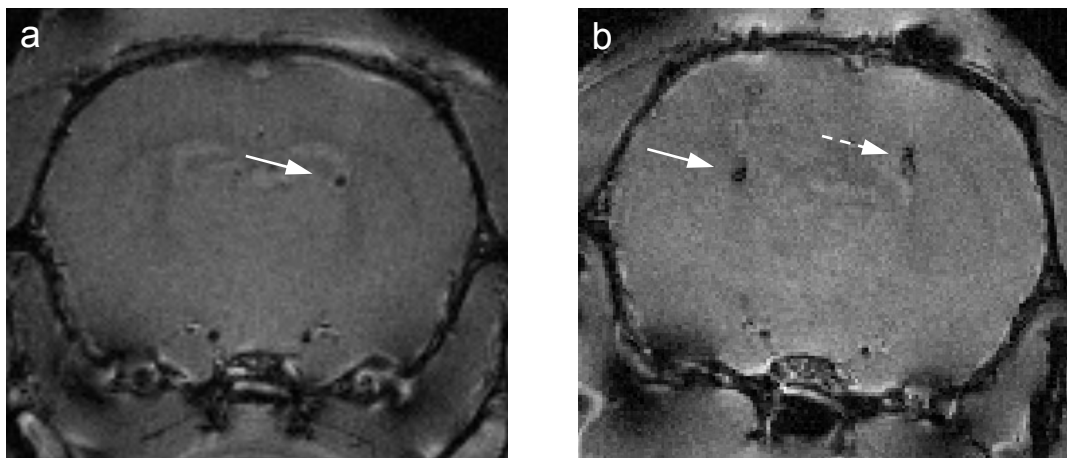


Abbildung 29: T2*-gewichtete Bildgebung bei 7 T in vivo 1 h nach intrastriataler Transplantation von magnetisch markierten mononukleären Zellen. a) Transplantation von 500 magnetisch markierten Knochenmarkszellen der Ratte (MBM), gelöst in 2 μ l NaCl und inkubiert mit 6 mM VSOP. b) Injektion von 10.000 magnetisch markierten Knochenmarkszellen der Ratte (MBM) (solider Pfeil) bzw. 10.000 magnetisch markierter humaner Zellen aus der Nabelschnur (HUCB)(gepunkteter Pfeil), inkubiert mit 6 mM VSOP.

Zusammenfassend zeigen die Versuche bei einer Feldstärke von 7 T (Bruker Pharmascan) ein Detektionslimit intracerebral injizierter Zellen von ca. 300, bei klinischen Feldstärken von 1,5 T (Siemens Sonata) von ca. 1000. Bei Höchstfeldstärken von 17,6 T liegt das Detektionslimit wie oben dargelegt bei unter 100 Zellen.

Bei der Modellierung dieser Abhängigkeit konnte bei einer monoexponentiellen Kurvenanpassung ein quadratischer Korrelationskoeffizient von 0,98 erreicht werden (Abb. 30), dieser lag bei der Annahme eines linearen Zusammenhanges lediglich bei 0,77.

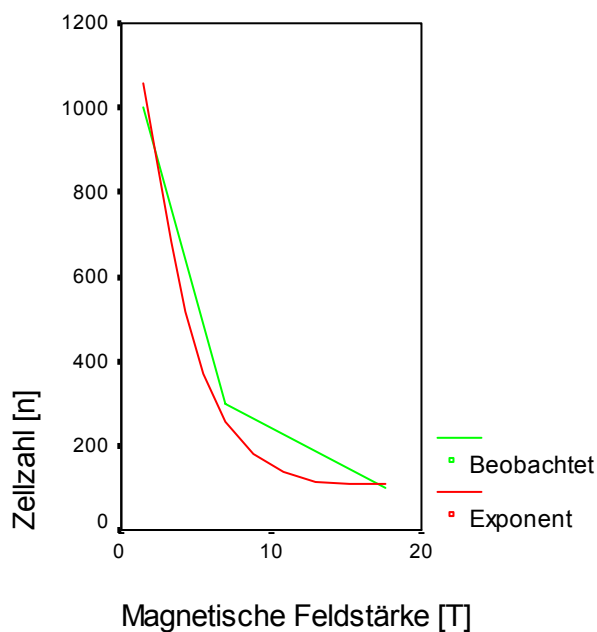


Abbildung 30: Modellierung des Zusammenhanges des Detektionslimits magnetisch markierter Zellen in vivo von der magnetischen Feldstärke. Die experimentellen Daten (grün) wurden mit einer monoexponentiellen Funktion approximiert (rot).

5 Transplantation von magnetisch markierten embryonalen

Stammzellen im Parkinson Modell der Ratte

Fragestellung

Das Ziel jeder intrastriatalen Transplantation von Stammzellen bei Morbus Parkinson ist die Restaurierung dopaminerger Funktionalität. Es ist zurzeit Gegenstand intensiver Forschung, welche Stammzellpopulation – embryonale Stammzellen, fötale Progenitorzellen oder adulte Stammzellen – dazu am besten in der Lage ist. Tierexperimentelle Studien zeigen, dass alle drei Zellpopulationen nach intrastriataler Injektion in unterschiedlichen Graden zu dopaminergen Neuronen differenzieren und sich funktionell in der neuronalen Umgebung des Wirtsorganismus integrieren. Eine Differenzierung embryonaler Stammzellen zu neuronalen Vorläuferzellen vor der Transplantation führt wie oben dargelegt sowohl zu einer deutlichen Verminderung des Risikos einer Teratomentstehung, als auch zu einer signifikanten Erhöhung des Anteils dopaminerger Neuronen. Dennoch wurden hier undifferenzierte embryonale Stammzellen transplantiert. Dies begründet sich darin, dass dopaminerge Vorläuferzellen, obgleich aus der Differenzierung embryonaler Stammzellen entstanden, eine neue Zellpopulation mit ggf. deutlich differenten Eigenschaften hinsichtlich der Aufnahme von Eisenoxidnanopartikeln darstellen. Zur Evaluierung des optimalen Markierungsprotokolles sind hohe Zellzahlen nötig (siehe oben). Diese waren jedoch nach der sechswöchigen Differenzierung von embryonalen Stammzellen mit den vorhandenen Laborkapazitäten nicht zu erreichen. Demzufolge wurden in der folgenden Studie undifferenzierte Stammzellen transplantiert, da der Schwerpunkt dieser Arbeit in der Visualisierung der Lokalisation und Migration der transplantierten Zellen zu sehen ist.

Die Studie sollte die folgenden Fragen beantworten:

- Können magnetisch markierte Stammzellen nach intrastriataler Injektion über eine Studiendauer von 6 Monaten spezifisch visualisiert werden?
- Inwieweit lässt sich eine eventuelle Migration der transplantierten Stammzellen kernspintomographisch erfassen?
- Findet sich eine Restaurierung dopaminerger Funktionalität, reflektiert in einer Verbesserung des amphetamininduzierten Rotationsverhaltens?

- Wie beeinflusst die eventuelle Degeneration der transplantierten Zellen das MR-Signal?
- Haben die beobachteten Hypointensitäten in der MRT auch nach sechs Monaten ein zelluläres Korrelat?
- Tritt nach eventueller Lyse der transplantierten eisenoxidmarkierten Zellen eine sekundäre Phagozytose durch ortsständige Makrophagen auf?
- Wie stellt sich histologisch der Phänotyp der transplantierten embryonalen Stammzellen nach sechs Monaten dar?

5.1 Kernspintomographische Studie über 6 Monate bei 7 T in vivo

Die kernspintomographischen Aufnahmen eines Kontrolltieres, das eine intrastriatale Injektion von 1×10^5 unmarkierten embryonalen Stammzellen 4 Wochen nach der Läsion des MFB durch 6-OHDA erhalten hatte, zeigte keine Signalauslöschungen, von einer leichten Demarkation des Stichkanals und anatomischen Strukturen abgesehen (Abb. 31 a). Die durch 6-OHDA vermittelte Läsion der Substantia Nigra scheint zu keinen weiteren kernspintomographischen Signalveränderungen zu führen, zumindest nicht in T2 und T2*-gewichteter Bildgebung. Auch die weiteren 5 Kontrolltiere zeigten sich unauffällig, Mikroblutungen traten nicht auf. 1×10^4 magnetisch markierten Zellen lassen sich als deutliche Hypointensität abgrenzen. Es zeigt sich eine homogene Signalauslöschung entlang des Stichkanals (Abb. 31 b). Nach der Injektion von 1×10^5 Zellen stellen sich ausgeprägte Hypointensitäten dar (Abb. 31 c), besonders zu beachten ist die deutliche Verbreiterung der Signalauslöschungen im Bereich des Corpus Callosum.

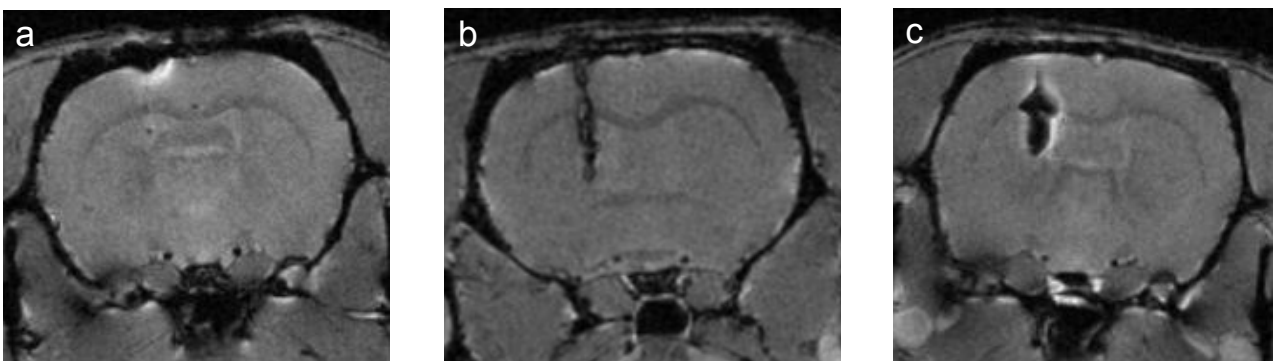


Abbildung 31: In vivo MRT 4 Wochen nach Transplantation von NaCl (a), 10.000 (b) bzw. 100.000 (c) magnetisch markierten embryonalen Stammzellen in das Striatum von 6-OHDA-läsionierten Ratten. Das Injektionsvolumen betrug 2 μ l, Zellen gelöst in NaCl. Die räumliche Auflösung beträgt $137 \times 137 \times 420 \mu$ m.

An der Grenzschicht der Signalauslöschungen zum umgebenden Hirnparenchym ist eine hyperintense Grenzschicht sichtbar. Diese hyperintensiven Artefakte sind typisch für Bereiche in denen es zu sprunghaften Änderungen der magnetischen Suszeptibilität kommt.

Abbildung 32 zeigt die T2*-gewichtete kernspintomographische Visualisierung von 100.000 magnetisch markierten Zellen zwei Tage, acht Wochen und 16 Wochen nach Transplantation. Die untere Bildreihe zeigt die auf Schwellenwerten der normierten Signalintensitäten basierte 3D Volumenrekonstruktion mittels der Visualisierungs- und Analysesoftware Amira. Es zeigte sich zwei Tage nach Transplantation eine ausgeprägte Hypointensität entlang des Stichkanals, wobei sich im Bereich des Corpus Callosum eine signifikante Verbreiterung der hypointensen Struktur darstellt. Es ergeben sich nach der 3D Volumenkonstruktion eine Anzahl von 976 hypointensen Voxeln ($7,7 \text{ mm}^3$). Das injizierte Volumen der Zellsuspension betrug $2 \mu\text{l}$ bzw. 2 mm^3 .

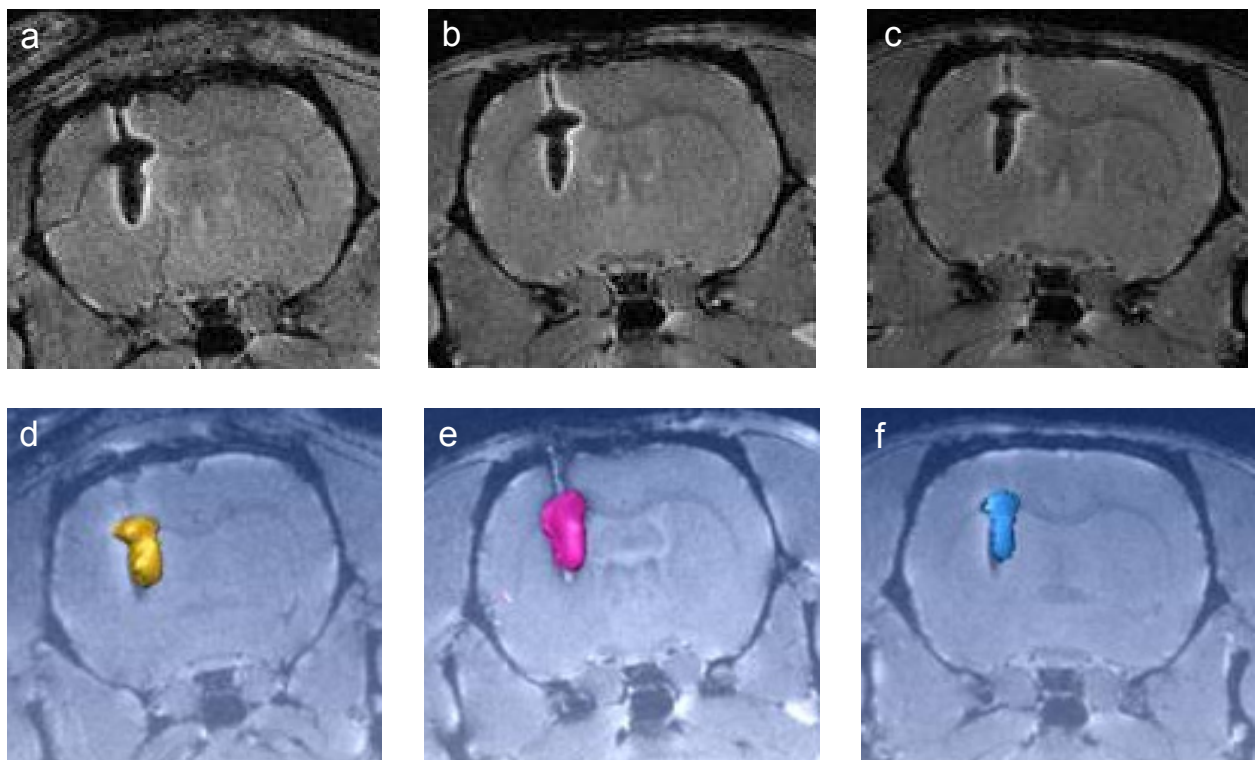


Abbildung 32: In vivo MRT bei 7T nach Transplantation von 100.000 magnetisch markierten embryonalen Stammzellen in das Striatum einer 6-OHDA-läsionierten Ratte. Das Injektionsvolumen betrug $2 \mu\text{l}$, Zellen gelöst in NaCl. a) Zwei Tage nach Transplantation, b) 8 Wochen n.T., c) 16 Wochen n.T. Die räumliche Auflösung beträgt $137 \times 137 \times 420 \mu\text{m}$, 3D-Volumenrekonstruktion mit Amira.

Acht Wochen nach Transplantation zeigt sich eine Volumenvergrößerung der Hypointensität, es ergeben sich 1467 hypointense Voxel ($11,6 \text{ mm}^3$), dies entspricht einer Volumenzunahme von 50 %. Die hypointense Struktur hat sich deutlich verbreitert. 16 Wochen nach Transplantation hingegen zeigt sich eine signifikante Verringerung des hypointensen Volumens, es ergeben sich nur noch 671 hypointense Voxel ($5,4 \text{ mm}^3$), deutlich unterhalb des Volumens zwei Tage nach der Injektion. Die Volumenmessungen nach 24 Wochen zeigen keine signifikanten Volumenänderungen im Vergleich zur Situation nach 16 Wochen. Die Analyse der weiteren 5 experimentellen Tiere ergibt ein vergleichbares Bild, eine deutliche Volumenzunahme der beobachteten Hypointensitäten in der zweiten und dritten kernspintomographischen Studie nach Transplantation, und eine darauf folgende Reduktion nach 16 Wochen, keine signifikante Veränderung nach 24 Wochen. Darüber hinaus zeigen sich weder bei dem unten dargestellten Tier noch bei den übrigen Tieren signifikante Änderungen der räumlichen Verteilung der Hypointensitäten.

Jedoch zeigten sich signifikante interindividuelle Unterschiede. So zeigt Abb. 33 drei verschiedene Tiere zum gleichen Zeitpunkt nach Transplantation, die Transplantation erfolgte zu den gleichen stereotaktischen Koordinaten. Im Tier a (d) stellt sich eine Verteilung der Hypointensitäten entlang des Stichkanals dar, ähnlich des obigen Tieres, jedoch findet sich eine deutliche Verteilung entlang des Corpus Callosum. Tier b (e) zeigte hingegen praktisch keine Signalauslöschungen im Bereich des Striatums, beinahe die gesamte Hypointensität ist im Bereich des Balkens lokalisiert. Besonders deutlich wird dies in der Volumenrekonstruktion (e), hier zeigt sich darüber hinaus ein kleineres abgegrenztes Depot am lateralen Ende des Corpus Callosum (Pfeil). Das Tier c (f) hingegen zeigt die räumlich am weitesten ausgedehnte Verteilung, neben Verteilungen entlang des Balkens findet sich eine flächige Struktur im Bereich des gesamten Stichkanals.

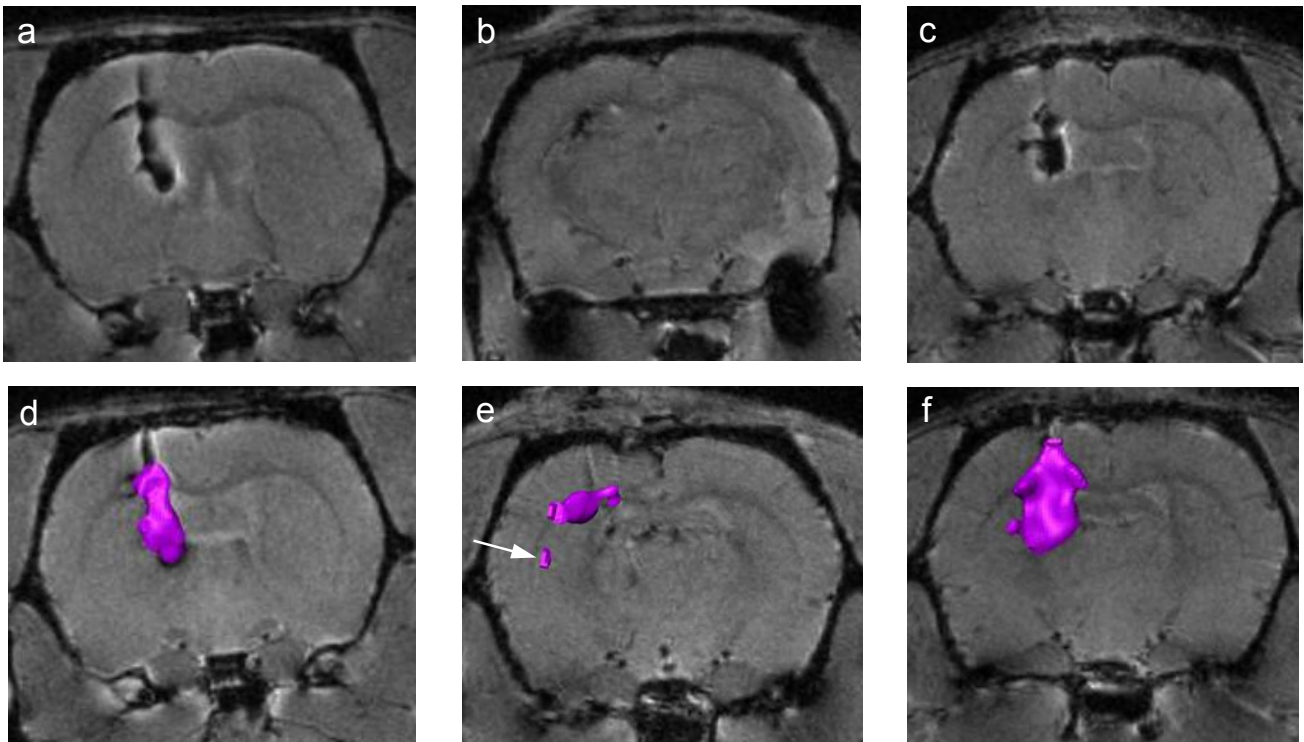


Abbildung 33: a – c: In vivo MRT 8 Wochen nach Transplantation von 100.000 magnetisch markierten embryonalen Stammzellen in das Striatum von 6-OHDA-läsionierten Ratten. d – f: Volumenrekonstruktion der hypointensen Struktur als farbiges 3D-Objekt (Amira)

5.2 Funktionelle Korrelation

Um eine funktionelle Restauration der motorischen Funktionen durch die Transplantation der magnetisch markierten Stammzellen zu erfassen, wurde das amphetamininduzierte Rotationsverhalten der Tiere vor und nach Transplantation gemessen. Vor Transplantation zeigten beide experimentelle Gruppen eine durchschnittliche Zahl von ca. 11 Rotationen / min. Bei einer funktionellen Dopaminausschüttung ist eine Reduktion der Rotationszahl zu erwarten. Dahingegen zeigen beide Gruppen nach der Transplantation von magnetisch markierten Stammzellen bzw. NaCl eine weitere Verschlechterung der motorischen Störung, im Durchschnitt ergaben sich 15 Rotationen / min, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellen ließ (Abb. 34). Die Transplantation von 1×10^5 magnetisch markierten Stammzellen vermochte somit keine Verbesserung der motorischen Funktionalität zu erreichen.

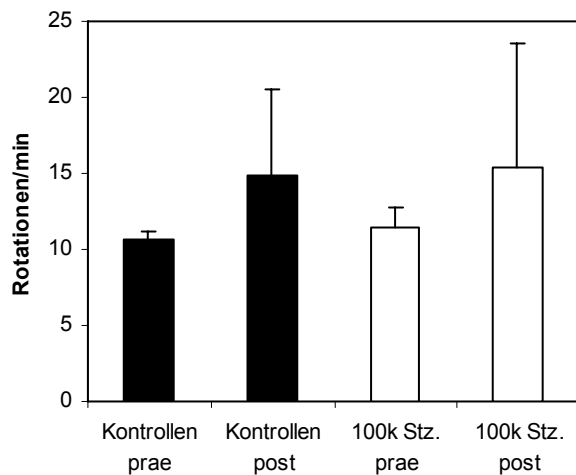


Abbildung 34: Amphetamininduzierte Rotation vor bzw. nach Transplantation von 100.000 magnetisch markierten embryonalen Stammzellen bzw. NaCl (Kontrollen).

5.3 Histologische Korrelation und Charakterisierung

Zur Klärung der Frage, inwieweit die beobachteten Hypointensitäten in der kernspintomographischen Bildgebung auch nach einer Studiendauer von sechs Monaten noch ein zelluläres Korrelat besitzen, wurde eine umfangreiche Analyse des histologischen Materials durchgeführt. Dabei wurden sowohl horizontale als auch frontale Gefrierschnitte in einer Dicke von 20 µm angefertigt. Da die embryonalen Stammzellen neben ihrer magnetischen Markierung auch stabil GFP (green fluorescent protein) exprimieren, wurde zunächst mittels confocaler Laser Scanning Mikroskopie nach nativer GFP-Fluoreszenz gesucht, um das Transplantat zu lokalisieren.

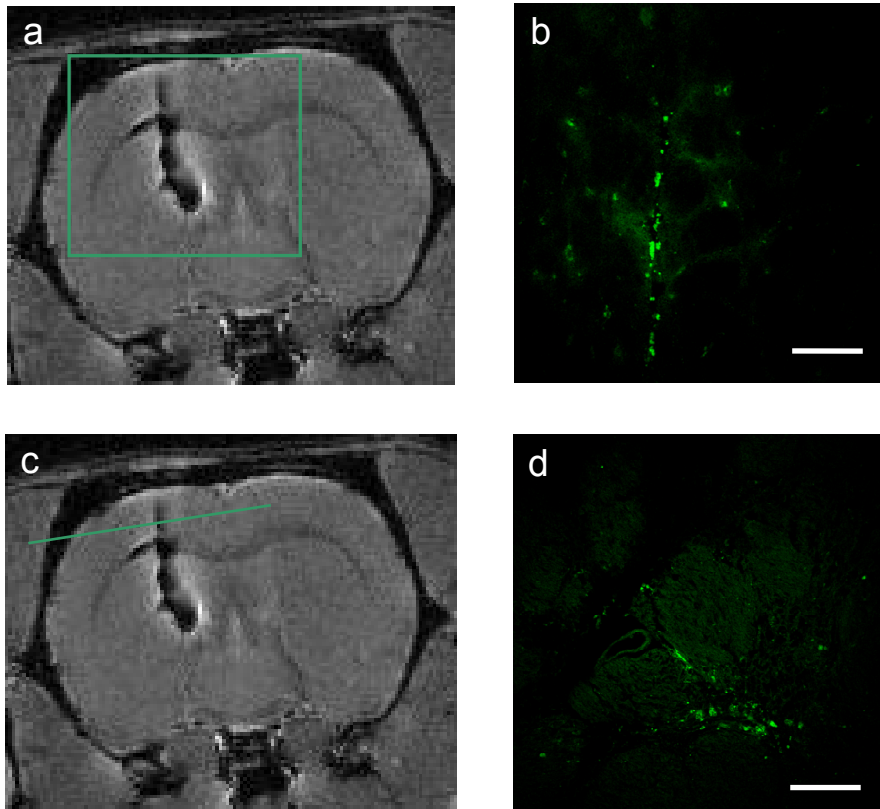


Abbildung 35: Histologische Korrelation der kernspintomographischen Hypointensitäten mit GFP-positiven Zellen. a), c): In vivo MRT 8 Wochen nach Transplantation von 100.000 magnetisch markierten embryonalen Stammzellen. b), d): Confocale Laser-Scanning Aufnahme der nativen GFP-Fluoreszenz. b) Frontale Schnittebene, wie in a) schematisch gezeigt. d) Horizontale Schnittebene, wie in c) schematisch gezeigt. Der Maßstab sind 100 µm.

Es zeigte sich, dass auch 6 Monate nach Transplantation in allen sieben Tieren die Injektionen magnetisch markierter GFP exprimierender Stammzellen erhielten (1 Tier 1×10^4 , 6 Tiere 1×10^5 Zellen) zelluläre Strukturen hoher Fluoreszenzemission im für GFP charakteristischen Wellenlängenbereich (500 - 550 nm) gefunden werden konnten.

Abbildung 35 b zeigt eine native confokale Laser Scanning Aufnahme in frontaler Schnittführung. Der Stichkanal ist deutlich als vertikaler Defekt demarkiert. Im Stichkanal sind ca. 30 Zellen mit hoher Fluoreszenzemission abzugrenzen. Im umgebenden Parenchym finden sich vereinzelte Zellen mit vergleichbarer Signalintensität. Auch in horizontaler Schnittführung (Abbildung 35 c) ist der Stichkanal als kleiner zentraler Defekt abzugrenzen. Auch hier finden sich Zellen hoher Fluoreszenzintensität, sowohl direkt im Stichkanal als auch lateral verteilt. Es findet sich jedoch nur in seltenen Fällen eine radiale Dispersion der Zellen, meist ist wie in Abbildung 35 c ersichtlich eine streifenförmige Verteilung der Zellen

vorhanden. Dies legt eine Verteilung entlang Bahnstrukturen nahe. Es fanden sich nur vereinzelte fluoreszenzintense Zellen, die nicht in direkter räumlicher Nachbarschaft zum Stichkanal standen. Dabei handelte es sich stets nur um punktuelle Fluoreszenzintensitäten, so dass Artefakte oder Autofluoreszenz in diesen Fällen nicht ausgeschlossen werden konnten. Die maximale Entfernung vom Stichkanal, in der eindeutige zelluläre Signale gefunden wurden, betrug ca. 1 mm. Nach der confokalen Laser Scanning Mikroskopie wurden die Schnitte, in denen GFP-Fluoreszenz detektiert wurde, mittels der konventionellen histochemischen Berliner Blau Färbung behandelt. Diese Färbung stellt eine spezifische und seit langem etablierte Detektionsmethode von sowohl freiem als auch biologisch gebundenem Eisen dar. Es fanden sich klar abgegrenzte zelluläre Strukturen starker blauer Farbintensität (Abbildung 36 a). Eine diffuse bläuliche Färbung, die bei einer extrazellulären Verteilung der Eisenoxidnanopartikel in der extrazellulären Matrix zu erwarten gewesen wäre, konnte nicht festgestellt werden. Das lichtmikroskopische Bild (Abb. 36 a) wurde mit den korrelierenden CLSM-Aufnahmen (Abb. 36 b) überlagert. Diese Überlagerung der beiden voneinander methodisch unabhängigen Bildgebungsmodalitäten zeigt eine Colokalisation der fluoreszenzintensiven mit den Berliner Blau positiven Zellen (Abb. 36 c). Es fanden sich nur vereinzelte fluoreszenzintensitäten, die nicht Berliner Blau positiven Signalen zugeordnet werden konnten. Es konnten im Umkehrschluss allen Berliner Blau positiven Zellen räumlich korrelierende GFP-Signale zugeordnet werden.

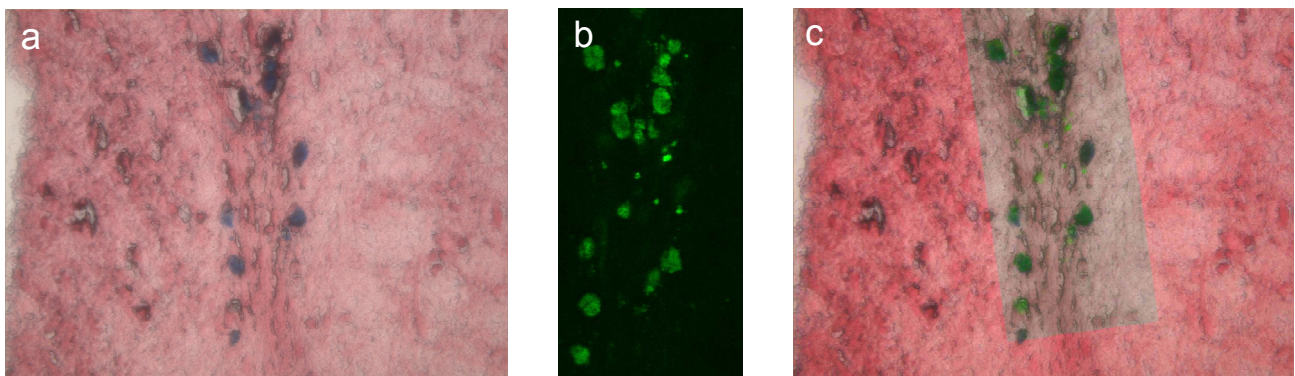


Abbildung 36: Räumliche Korrelation GFP-positiver mit Eisen-positiver Zellen. a) Histochemische Berliner Blau Färbung. b) GFP-positive Stammzellen, detektiert mittels CLSM. c) Überlagerung beider Bilder.

Zur histologischen Abschätzung der Überlebensrate der transplantierten embryonalen Stammzellen, wurde an einem Tier, dass 1×10^5 Zellen erhielt, eine

Quantifizierung anhand der nativen GFP-Fluoreszenz durchgeführt. Eine zelluläre Struktur mit hoher Fluoreszenzintensität im Bereich der GFP-Emission stellt den wahrscheinlichsten Hinweis dar, dass es sich um eine transplantierte, exogene Zelle handelt. Bei der Berliner Blau Färbung kann eine andere Quelle eines positiven Signals, wie z.B. Hämoglobin oder durch sekundäre Phagozytose aufgenommene Eisenoxidpartikel nicht ausgeschlossen werden.

Abbildung 37 stellt die schematische Übersicht der Quantifizierung der GFP-positiven Zellen dar. Es kann sich dabei nur um eine Abschätzung der Zellzahl handeln, eine Auszählung aller 130 verfügbaren Schnitte war nicht zu realisieren. Abbildung 37 a zeigt die Volumenrekonstruktion der T2*-gewichteten Hypointensitäten. Die anhand von anatomischen Strukturen approximierte Position des ersten und letzten untersuchten Schnittes ist dargestellt. Insgesamt konnten in den 130 Schnitten, die mit einer individuellen Schnittdicke von 20 µm somit 2,6 mm des insgesamt 5 mm langen Stichkanals abbilden, 5300 positive Zellen gefunden werden. In den fehlenden 2,4 mm des Stichkanals ist eine Zellzahl gleicher Größenordnung anzunehmen, ausgehend von der räumlichen Verteilung der Hypointensitäten in Abbildung 37 a. Insgesamt ergibt sich somit eine Zellzahl von ca. 10.000, wobei aufgrund der vielen notwendigen Schätzungen und Vereinfachungen von einer Streuung von mindestens 50 % auszugehen ist.

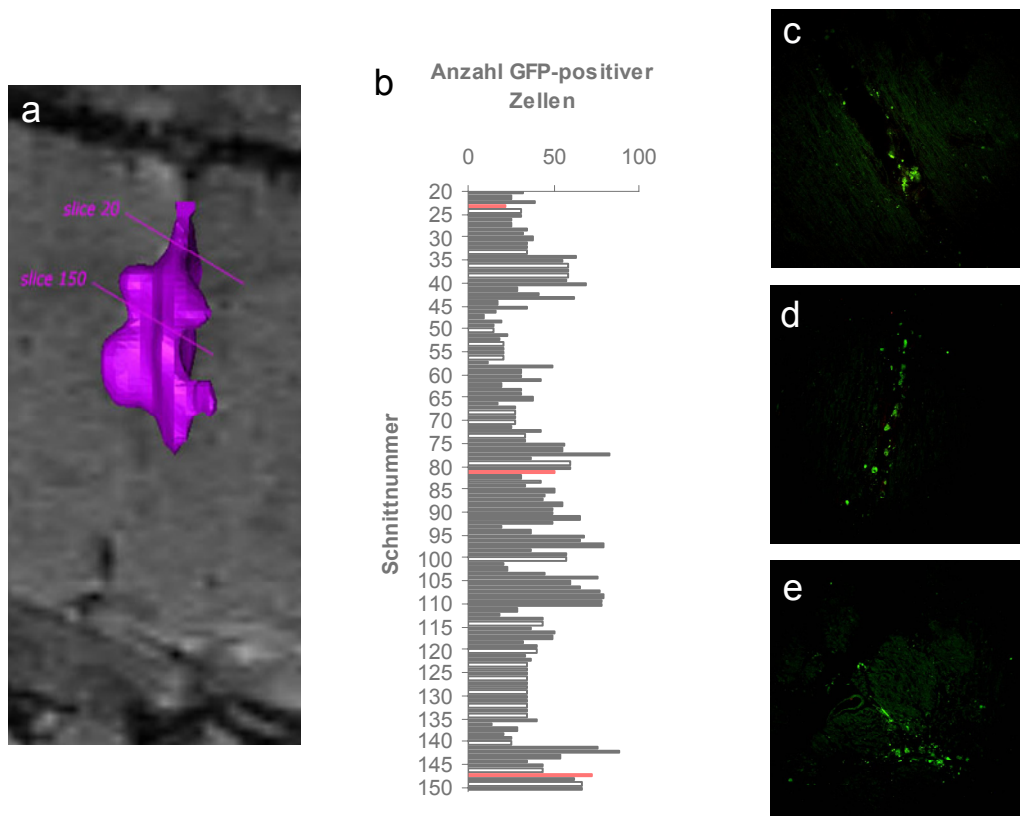


Abbildung 37: Quantifizierung der GFP-positiven Zellen zur Abschätzung der Überlebensrate der transplantierten Stammzellen. a) In vivo MRT 6 Monate nach Transplantation von 100.000 magnetisch markierten Stammzellen. Sagittale Schichtführung, T2*-gewichtete Hypointensitäten sind als farbiges 3D-Objekt visualisiert. Die räumliche Korrelation zu den histologischen horizontalen Schnitten ist anhand des ersten untersuchten Schnittes (slice 20) und des letzten untersuchten Schnittes (slice 150) schematisch dargestellt. b) Grafische Darstellung der Anzahl der GFP-positiven Zellen pro histologischem Schnitt von 20 µm Dicke. Aus praktischen Gründen (Die Untersuchungszeit pro Schnitt betrug ca. 2 h) konnten nicht alle 130 histologischen Schnitte untersucht werden. Die eingefärbten Balken stellen untersuchte Schnitte dar, die hellen Balken stellen die Mittelwerte der Zellzahl des davor bzw. danach liegenden untersuchten Schnittes dar. c), d), e) Exemplarische Darstellung der CLSM-Aufnahmen, die korrespondieren Schnittnummern sind in b) rot eingefärbt (c) 23, d) 81, e) 147).

Zur phänotypischen Charakterisierung wurden die Gefrierschnitte mit primären Antikörpern spezifisch für embryonale Stammzellen (SSEA1), Makrophagen (CD 11b) und frühe neuronale Marker (Nestin und β -3-Tubulin) inkubiert. Mittels CLSM, einem rot fluoreszierenden sekundären Antikörper und der simultanen Detektion zweier unabhängiger Fluoreszenzbandbreiten, konnte sowohl die native GFP-Fluoreszenz als auch die Fluoreszenz des Sekundärantikörpers detektiert werden.

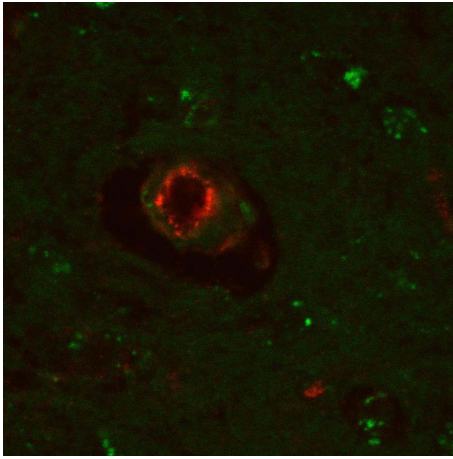


Abbildung 38: CLSM-Aufnahme eines horizontalen Gefrierschnittes, es ist die Überlagerung beider simultan aufgenommenen Fluoreszenzkanäle dargestellt. Der grüne Kanal ist von der Emission der nativen GFP-Fluoreszenz dominiert, der rote Kanal von der Emission des fluoreszierenden Sekundärantikörpers, gebunden an den Primärantikörper gegen den Makrophagenmarker CD11b. Der Maßstab sind 20 μ m.

In Abbildung 38 stellt sich in horizontaler Schnittebene der Stichkanal als zentraler Defekt dar. Zellen hoher roter Fluoreszenzintensität finden sich kreisförmig um den Stichkanal aggregiert. Es zeigt sich keine Überlagerung der nativen GFP-Fluoreszenz mit der Fluoreszenz des Sekundärantikörpers des Makrophagenmarkers CD11b.

Zur Feststellung des Phänotyps der GFP-positiven Zellen wurde zunächst Antikörper gegen den Stammzellmarker SSEA1 verwendet. Die confokale Analyse zeigte nur sehr vereinzelte SSEA1-Fluoreszenz der GFP-positiven Zellen. Auch eine Colokalisation mit frühen neuronalen Markern wie Nestin und β -3-Tubulin konnte nicht nachgewiesen werden.

6 MRT von systemisch injizierten Vorläuferzellen im

Schlaganfallmodell der Maus bei 7 T in vivo

Fragesstellung

Die vorangegangenen Untersuchungen zeigten, dass eine nicht-invasive Bildgebung magnetisch markierter Zellen möglich ist, ohne die Zellen bzw. das Wirtsgewebe nennenswert zu belasten. Des Weiteren konnten bereits geringe Zellzahlen sicher nachgewiesen werden, auch die Darstellung von eisenoxidmarkierten Zellen über einen Zeitraum von sechs Monaten konnte gelingen. Diese beiden Grundvoraussetzungen sollten auch eine Bildgebung systemisch injizierter Zellen möglich machen. Hierbei ergeben sich eine Reihe von neuen Schwierigkeiten, so ist im Gegensatz zur direkten intracerebralen Injektion der Ort der Zellaggregation nicht bekannt und die Zellen müssen sicher von pathologischen Veränderungen abgegrenzt werden. Auf der anderen Seite eröffnet eine nicht-invasive Methodik die Möglichkeit, Aussagen über die Dynamik einer Zellaggregation bzw. –migration zu treffen. Bei der experimentellen zellbasierten Therapie der cerebralen Ischämie sind insbesondere Fragen der Dynamik des Einwanderns der injizierten Stamm- bzw. Progenitorzellen von größter Bedeutung. Im Einzelnen stellten sich die folgenden Fragen:

- Lassen sich eisenoxidmarkierte Zellen auch nach systemischer Injektion nachweisen oder findet durch die vaskuläre Passage eine zu große Verdünnung der Zellen statt?
- Ist die T2*-gewichtete MR-Bildgebung auch in einer akuten Pathologie in der Lage, eisenoxidmarkierte Zellen spezifisch zu erfassen?
- Lassen sich verschiedene Transplantationsprotokolle hinsichtlich ihrer Effektivität miteinander vergleichen?
- Ist es möglich die Dynamik der Anreicherung der exogenen Zellen zu erfassen?

6.1 T2-gewichtete Bildgebung

Nach 30 bzw. 60 minütiger Okklusion der Arteria cerebri media (MCAO) gefolgt von Reperfusion wurden den Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten entweder magnetisch markierte mononukleäre Zellen (MNC) oder NaCl in die Schwanzvene injiziert (siehe Abb. 3). 12 Stunden nach MCAO stellten sich bei allen Tieren in der T2-gewichteten Bildgebung Hyperintensitäten dar, die ihr Maximum nach ca. 48 Stunden erreichten (Abb. 39). Nach 30 minütiger MCAO waren die hyperintensiven Signalveränderungen auf das ipsilaterale caudale Putamen beschränkt, wohingegen nach 60 minütiger MCAO zusätzlich Teile des Cortex und der Hippocampus betroffen waren. 4 Tage nach MCAO begannen die Hyperintensitäten zu verblassen, nach 7 bis 10 Tagen zeigten sich an gleicher Lokalisation in den meisten Fällen hypointense Signalveränderungen.

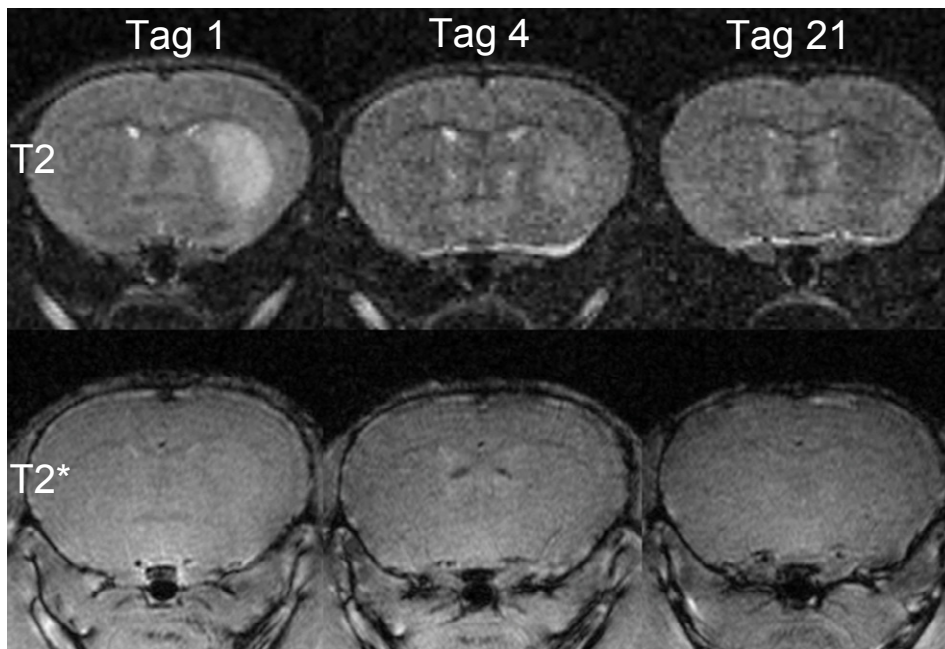


Abbildung 39. T2 und T2*-gewichtete Bildgebung einer Kontrollmaus im Zeitverlauf nach 30 minütiger MCAO. 24 h nach MCAO stellt sich das ischämische Areal als T2-Hyperintensität dar. Nach 4 Tagen kommt es zu einem Verblassen dieser Hyperintensität und zum Auftreten einer Hypointensität nach ca. 7 - 10 Tagen, diese bleibt bis zum Ende des Experiments konstant. In der T2*-gewichteten Bildgebung ist die Ischämie nicht sicher zu erkennen. Weitere Signalveränderungen abgesehen vom anatomischen Kontrast treten nicht auf.

Hinsichtlich dieser Dynamik der Läsionsentwicklung fanden sich keine Unterschiede zwischen Tieren, denen magnetisch markierten Zellen oder NaCl injiziert wurden. Neben der beschriebenen Läsionsdynamik fanden sich keine weiteren Signalveränderungen in der T2-gewichteten Bildgebung.

6.2 T2*-gewichtete MR-Bildgebung

Bei den Höchstfelduntersuchungen bei 17,6 T zeigte sich, dass bei längeren Echozeiten das Volumen der hypointensen Signalveränderungen in der T2*-gewichteten Bildgebung nach einer lokalen Injektion von magnetisch markierten Zellen ansteigt (siehe oben). Da bei dieser Studie einer hohen Sensitivität eine entscheidende Bedeutung zukommt, wurden zu Beginn der Studie zusätzliche kernspintomographische Messungen bei längeren Echozeiten durchgeführt. Die evaluierten längeren Echozeiten von 10,4 und 15,4 ms führten jedoch zu signifikant niedrigeren Signal-zu-Rausch-Verhältnissen. Darüber hinaus zeigte sich eine hohe Artefaktanfälligkeit, auch in Kontrolltieren stellten sich in der grauen Substanz erhebliche hypointense Signalveränderungen dar. Im Gegensatz dazu zeigte die T2*-gewichtete Bildgebung bei 5,4 ms Echozeit ein signifikant besseres Signal-zu-Rausch-Verhältnis. Darüber hinaus zeigten sich bei 6 von 9 Kontrolltieren in keinem Bereich des Gehirns zu keinem Zeitpunkt hypointense Signalveränderungen, von anatomischen Strukturen abgesehen. Lediglich in zwei Kontrolltieren stellten sich einige ellipsoide, schattierte, hypointense Signalveränderungen in einer Fläche von ca. 100 Voxeln (ca. $1,8 \text{ mm}^2$) dar, ohne räumliche Präferenz über das Gehirn verteilt. Diese Hypointensitäten erstreckten sich nicht weiter als über eine Schichtdicke (0,4 mm). Die numerische Analyse bestätigte die fluktuierende Natur dieser Hypointensitäten der Kontrollmäuse. Ein weiteres Kontrolltier zeigte scharf abgegrenzte stark hypointense Signalveränderungen im Kernbereich des ischämischen Areals. Diese Signalveränderungen konnten histologisch Mikroblutungen zugeordnet werden (siehe unten).

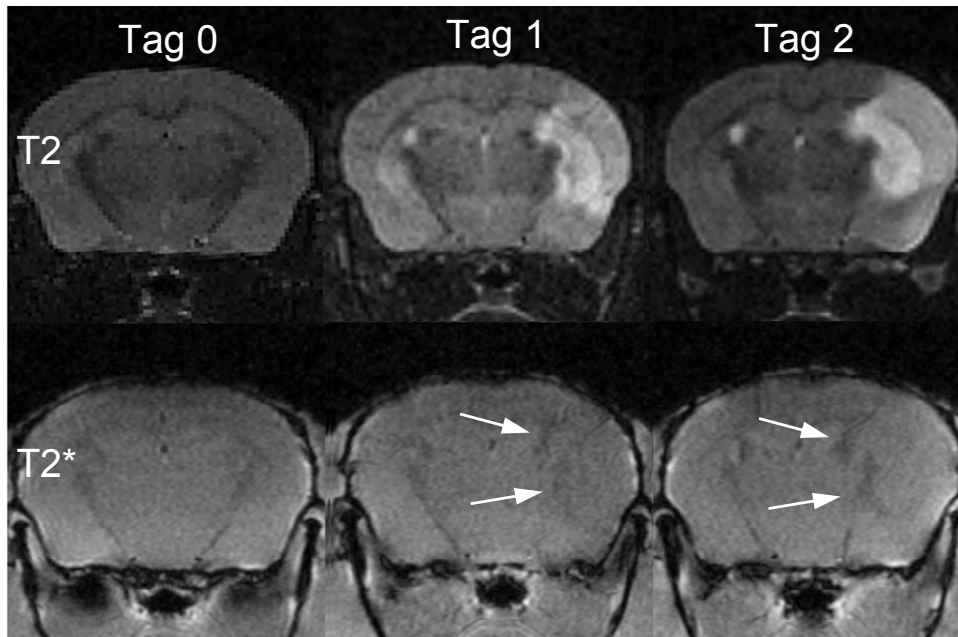


Abbildung 40: T2 und T2-gewichtete Bildgebung einer Maus nach systemischer Injektion von magnetisch markierten MNC 8 h nach Okklusion der MCA. Die T2-gewichteten Aufnahmen (obere Reihe) zeigen die typische zeitliche Entwicklung einer ischämischen Läsion. Es treten keine zusätzlichen Signalveränderungen auf. In den T2*-gewichteten Aufnahmen (untere Reihe) stellen sich am Tag 1 nach Transfusion hypointense Signalveränderungen in räumlicher Nähe zur ischämischen Läsion dar. Am Tag 2 erreichen sie ihre maximale Intensität.*

Im Gegensatz dazu zeigten sich ca. 48 h nach der Injektion der magnetischen markierten Vorläuferzellen bei 13 der 20 Tiere hypointense Signalveränderungen (Abb. 40). Diese stellten sich im Randbereich der ischämischen Läsion dar, und zwar sowohl striatal (30 und 60 min MCAO) als auch cortical (60 min MCAO). Die durchschnittliche Fläche der runden bis ellipsoiden Signalauslöschungen betrug 80-100 Voxel (0,18 bis 1,4 mm²) in der Bildebene, sie erstreckten sich über zwei Schichtdicken (ca. 0,8 mm). In Abgrenzung zu den beobachteten Signalveränderungen der Kontrolltiere (siehe oben); **i)** entwickelten sie sich nur nach der Injektion der Zellen; **ii)** blieben in Lokalisation und Intensität konstant über alle kernspintomographischen Untersuchungen.

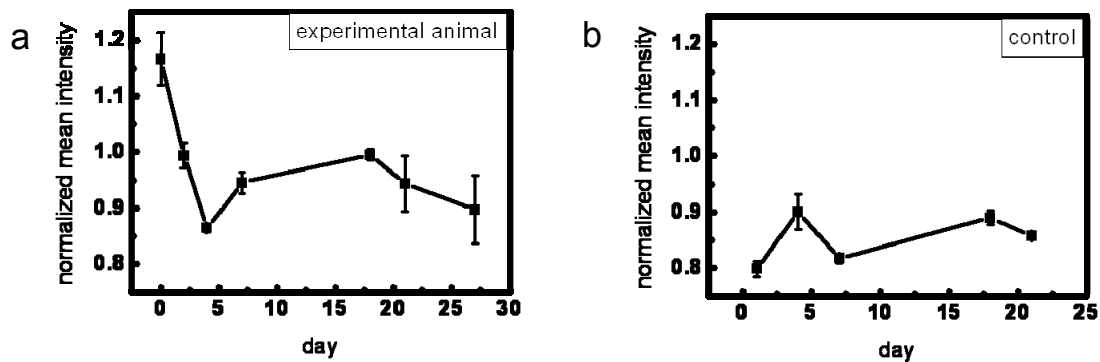


Abbildung 41: Numerische Analyse der normierten Signalintensitäten in definierten hypointensen regions-of-interest. a) Dynamik der mittleren Signalintensität bei einer Maus nach Injektion magnetisch markierter MNC: Es stellt sich ein deutlicher Signalabfall in der ersten drei Tagen dar, die Hypointensität bleibt über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant. b) Dynamik der mittleren Signalintensität einer Hypointensität in einer Kontrollmaus. Es stellt sich keine vergleichbare Dynamik dar.

Um die Dynamik der Entwicklung der oben beschriebenen hypointensen Signalverläufe zu erfassen, wurden die T2*-gewichteten Aufnahmen aller Messzeitpunkte normiert und coregistriert. Hypointense Signalveränderungen am Tag vier nach Transplantation wurden visuell identifiziert und regions-of-interest (ROI) definiert. Die ROI wurde nun auf die früheren und späteren Messungen übertragen. Somit ist der zeitliche Verlauf der mittleren Signalintensität zu erfassen. In Abbildung 41 zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den vereinzelt Hypointensitäten, die in drei Kontrollmäusen beobachtet wurden (Abb. 41 b) und den Hypointensitäten, die sich nach 24 - 48 h bei den Tieren entwickelten, denen magnetisch markierte Zellen injiziert wurden (Abb. 41 a). Die numerische Analyse dieser Signalveränderungen zeigt einen signifikanten Abfall der T2*-Signalintensität, die ihr Minimum nach 96 h erreicht und über alle folgenden Messungen stabil bleibt.

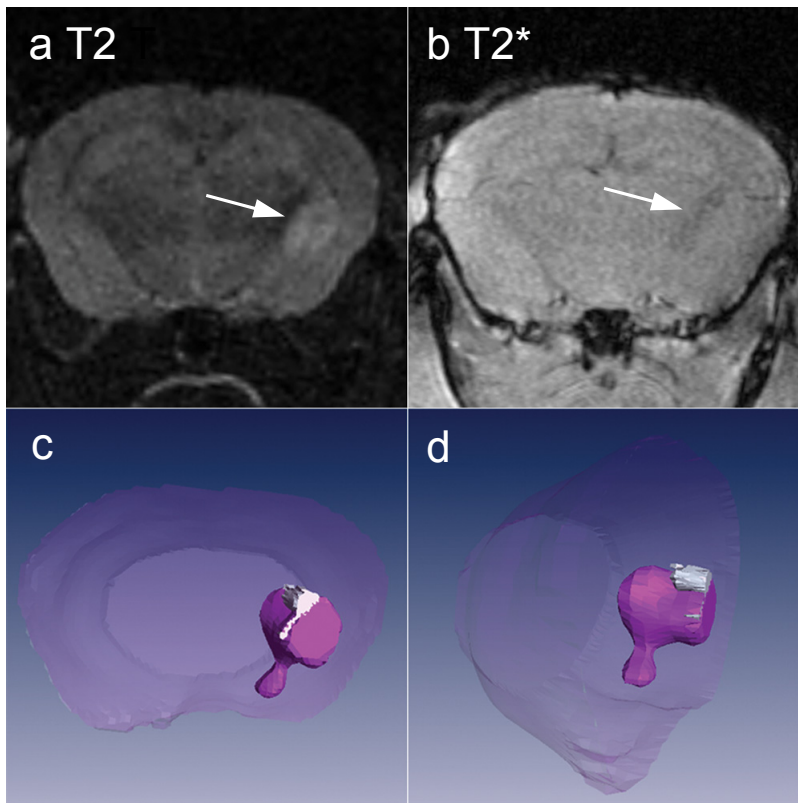


Abbildung 42: T2- bzw. T2*-gewichtete Bildgebung 4 Tage nach 30 minütiger MCAO und Injektion magnetisch markierter Vorläuferzellen (Gruppe3, Kategorie ++). Im T2-gewichteten Bild (a) stellt sich die Läsion als hyperintenses Areal in der linken Hemisphäre dar (Pfeil). Die T2*-gewichtete Bildgebung (b) zeigt hypointense Signalveränderungen in der linken Hemisphäre. Die Volumenrekonstruktion der T2-gewichteten Hyperintensitäten grenzt das ischämische Areal als rotes 3D-Objekt ab. Die T2*-Hypointensitäten sind als graues 3D-Objekt dargestellt. Die Zusammenführung beide Objekte im gleichen Bildraum (c, d) zeigt, dass die T2*-Hypointensitäten räumlich direkt dem ischämischen Areal anliegen, eine Colokalisation liegt jedoch nicht vor.

Interessanterweise erstreckten sich die beobachteten Hypointensitäten niemals bis in den Kernbereich des ischämischen Areals (Abb. 42). Bei 3 der 13 Tiere entwickelten sich zusätzlich Hypointensitäten um den dritten Ventrikel und um den kontralateralen lateralen Ventrikel herum. Injektion von freiem VSOP führte in einer Dosis vergleichbar zu der zellulär aufgenommenen Menge zu keinen Signalveränderungen.

6.3 Histologische Korrelation

Innerhalb von 24 h nach der letzten kernspintomographischen Untersuchung wurden die Tiere getötet und die Gehirne histologisch aufgearbeitet. Es wurden coronale Schnitte in einer Dicke von 40 μm angefertigt und jeder 5. Schnitt wurde zur Detektion eisenoxidmarkierter Zellen mit der Berliner Blau Färbung behandelt. Zusätzlich wurden bei dem Vorhandensein Berlin Blau positiver Zellen die jeweils benachbarten Schnitte gefärbt.

Bei 8 der 9 Kontrolltiere wurden keine Berliner Blau positive Zellen gefunden, dies beinhaltet auch die beiden Tiere, die transiente Hypointensitäten aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigte das Kontrolltier mit den stark abgegrenzten Signalauslösungen eine Nekrose im Bereich der MCA Okklusion, multiple Mikroblutungen und eine signifikante Anzahl Berliner Blau positiver Zellen.

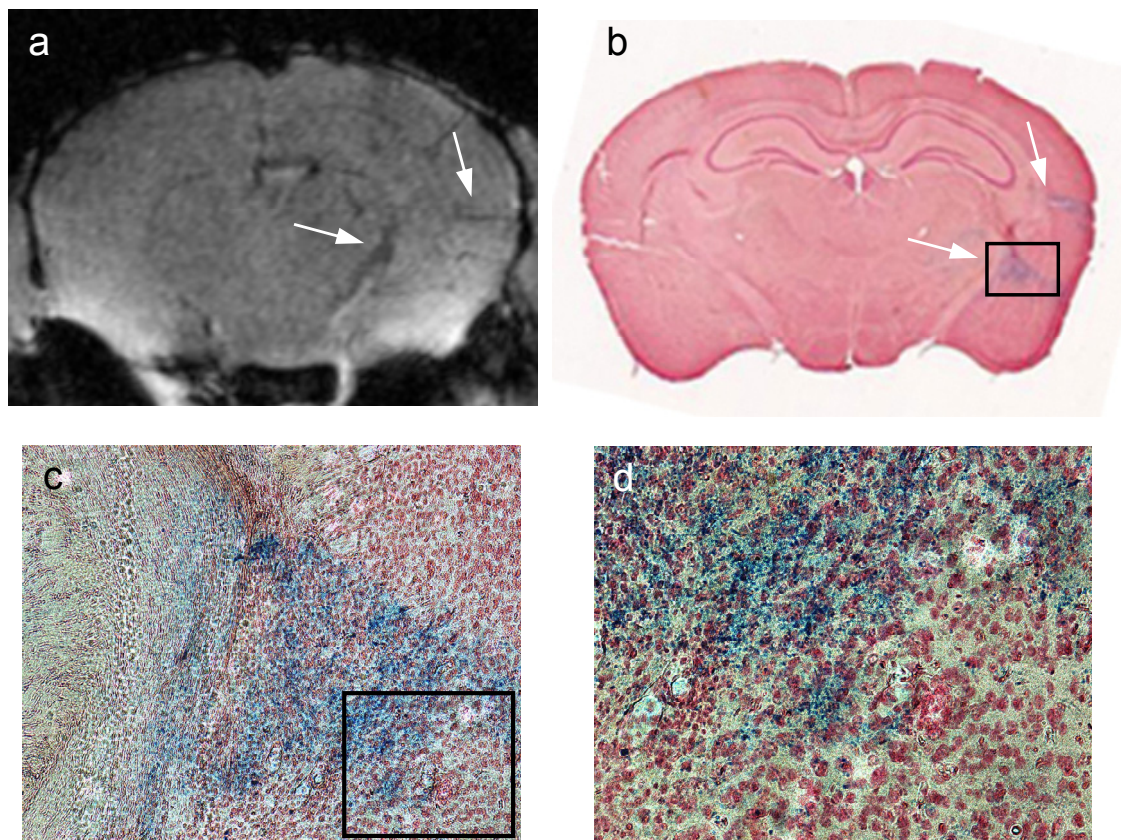


Abbildung 43. T2*-Hypointensitäten nach MCAO und Injektion magnetisch markierter Zellen (Gruppe 4, Kategorie +++) mit korrespondierender Histologie. a) T2*-gewichtete Bildgebung 4 Tage nach Injektion der Zellen. Es sind mehrere hypointense Areale in der linken ischämischen Hemisphäre zu sehen. Berliner Blau positive Zellen finden sich in räumlicher Korrelation zu den T2*-gewichteten Hypointensitäten. b) Überblick, c) 100 \times , d) 400 \times .

In allen 20 Tieren denen VSOP-markierte MNC injiziert wurden, fanden sich zumindest vereinzelte Berliner Blau positive Zellen. Jedoch zeigte sich eine große interindividuelle Variabilität, neben einzelnen positiven Zellen fanden sich auch Zellaggregate mit 50-100 Zellen pro histologischem Schnitt. Diese Zellaggregate fanden sich jedoch nur in jenen 13 Tieren, in denen sich auch deutliche T2*-gewichtete Hypointensitäten darstellten. Alle Aggregate von 10 oder mehr Zellen pro histologischem Schnitt konnten zu T2*-Signalauslöschungen räumlich korreliert werden. In der Gruppe der 7 Tiere, die nach der Injektion von VSOP-markierten MNC keine T2* Signalveränderungen aufwiesen, fanden sich auch nur einzelne Berliner Blau positiven Zellen. Nichtsdestotrotz konnten lediglich ca. 80 % aller Hypointensitäten eindeutig mit Berliner Blau positiven Zellen räumlich korreliert werden.

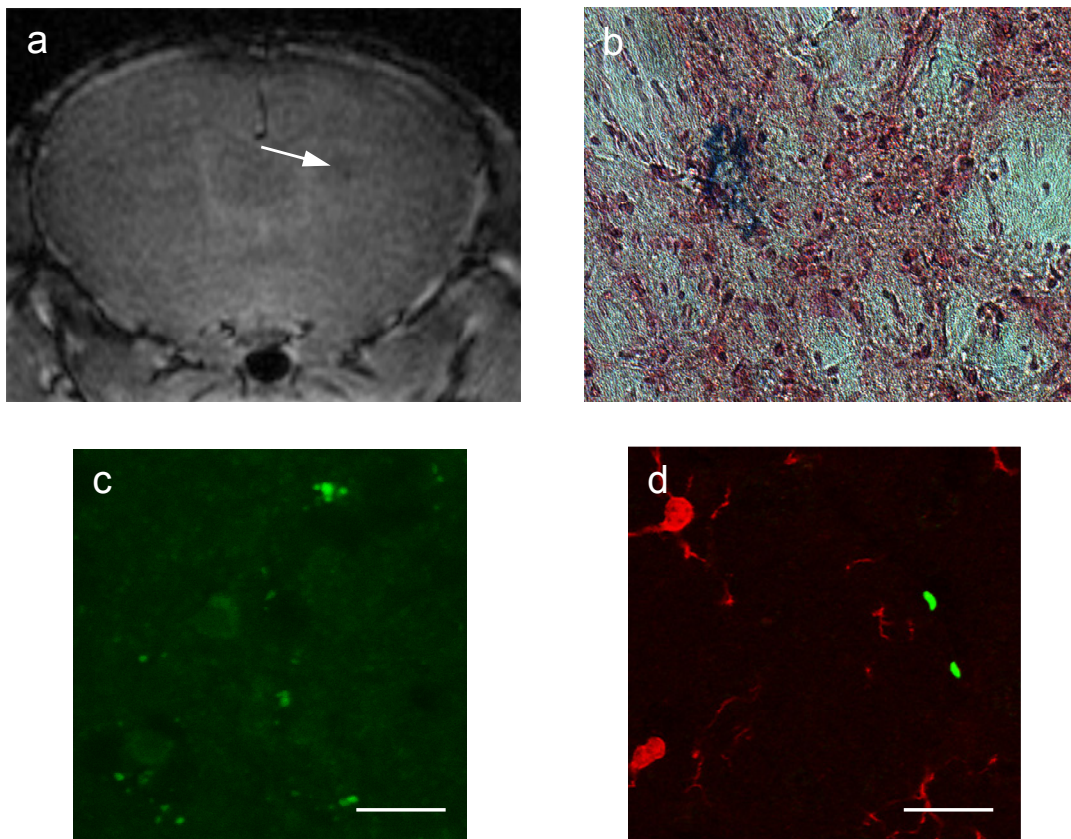


Abbildung 44: Multimodale Korrelation des T2-gewichteten hypointensen kernspintomographischen Signals. a) Kernspintomographische Bildgebung 4 Tage nach Injektion magnetisch markierter MNC, es stellt sich eine kleine hypointense Struktur dar (Pfeil). b) Histologisch finden sich Berliner-Blau positive Zellen in räumlicher Korrelation zum MR-Signal (100 x). c) CLSM-Aufnahme nativer GFP Fluoreszenz des benachbarten histologischen Schnittes. Der Maßstab sind 30 µm. d) CLSM-Aufnahme nach Inkubation mit Iba 1 Antikörper, die GFP-positiven Zellen zeigen keine Doppelfärbung. Der Maßstab sind 15 µm.*

6.4 Vergleich der Transplantationsprotokolle

Zwischen den verschiedenen Transplantationsprotokollen fanden sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Anzahl, der Ausdehnung und der Signalintensität der T2*-gewichteten Hypointensitäten. Demzufolge wurde ein semiquantitatives Bewertungssystem entwickelt (Kategorien 0, +, ++, +++) um für jedes Tier das Ausmaß der T2*-Hypointensitäten bzw. der damit korrelierenden Anzahl Berliner Blau positiver Zellen festzulegen.

Tabelle 3: Semiquantitativer Vergleich der Effektivität der verschiedenen Zeitpunkte der Injektion mononukleärer Zellen nach Induktion der cerebralen Ischämie.

Gruppe	Kat. 0	Kat. +	Kat. ++	Kat. +++	Σ
1 (30 min, 0,5 h)	1	2	1	-	4
2 (30 min, 8h)	1	-	4	-	5
3 (30 min 24h)	4	1	1	-	6
4 (60 min, 8h)	1	-	1	3	5
Σ	7	3	7	3	20

Wie in Tabelle 3 ersichtlich finden sich die höchsten Bewertungen (Kategorien ++ und +++) bei Tieren der Gruppen 1 und 4, sie erhielten die Zellen 8 h nach Okklusion der MCA. Innerhalb dieser beiden Gruppen zeigten die Tiere mit einer 60 minütigen Okklusion der MCA (Gruppe 4) die weitaus besten Ergebnisse (Kategorie +++). Im Gegensatz zeigten die Tiere der Gruppe 3 (30 min. MCAO, Injektion der Zellen nach 24 h) die niedrigsten Bewertungen.

7 Diskussion

7.1 Zelluläre magnetische Markierung

Die magnetische Markierung von Zellen mit Eisenoxidnanopartikeln ist seit mehr als 10 Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Hinsichtlich der optimalen Größe der Partikel und der besten Zusammensetzung der Hüllstruktur für die zelluläre MR-Bildgebung existieren eine Vielzahl von Studien [51, 54, 55]. Wenn die Größe der Partikel bzw. die Ladung der Hüllstruktur keine Inkorporation via unspezifischer Endozytose zuließ, wurde versucht die intrazelluläre Aufnahme durch die Kopplung der Partikel mit Translokationspeptiden [54] oder durch Lipofektion [25, 53] zu ermöglichen bzw. weiter zu erhöhen. Hinsichtlich ihrer magnetischen Eigenschaften scheinen große Partikel aufgrund ihrer höheren Relaxivität prinzipiell von Vorteil zu sein [56], obgleich jedoch sichergestellt werden muss, dass die magnetische Markierung die Viabilität der markierten Zellen nicht beeinflusst [57].

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass die etwas größeren Eisenoxidnanopartikel VSOP C200 von den Zellen wesentlich besser aufgenommen werden als die kleineren Partikel C184 gleicher Hüllstruktur. Jedoch scheint der Zusammensetzung der Hülle und insbesondere ihrer elektrischen Oberflächenladung eine mindestens ebenso große Bedeutung zuzukommen, frühere Studien der Arbeitsgruppe zeigen eine wesentlich höhere zelluläre Aufnahme der zitratbeschichteten VSOP mit saurer Oberflächenladung im Vergleich zu den größeren neutralen Dextran-ummantelten USPIO [51].

Hinsichtlich der Menge an aufgenommenen magnetischen Nanopartikeln stellten sich erhebliche Unterschiede zwischen den hier untersuchten Zellpopulationen dar. Murine embryonale Stammzellen zeigen eine sehr hohe Eisenaufnahme schon bei geringen Inkubationskonzentrationen, vergleichbar mit Makrophagen (RAW). Primärzellen hingegen, seien es mononukleäre Zellen oder fetale Mittelhirnzellen, benötigen hohe Inkubationskonzentrationen für eine signifikante Eisenaufnahme. Die hohe Endozytoserate der Makrophagenzelllinie verwundert nicht, jedoch kann der Grund der ebenso hohen Endozytoserate der embryonalen Stammzellen nicht geklärt werden, ggf. ist sie mit der hohen Stoffwechselrate aufgrund der hohen Proliferationsrate in Verbindung zu setzen.

Neben einer möglichst hohen Beladung der Zellen mit Eisenoxidnanopartikeln kommt der Stabilität dieser Markierung eine entscheidende Bedeutung zu. Über die

Biodegradation von zellulär aufgenommenen Eisenoxidnanopartikeln existieren bislang nur vereinzelte *in vitro* Studien [48, 58]. Diese Studien zeigen eine Degradation der Partikel innerhalb von 3-15 Tagen, verursacht durch das saure Milieu innerhalb der Endosomen bzw. Lysosomen. Die Biodegradation sollte jedoch in hohem Maße von der Zusammensetzung der Hülle abhängen, für die zitratbeschichteten VSOP existieren noch keine Untersuchungen. Die innerhalb dieser Studie durchgeführten Stabilitätsuntersuchungen an magnetisch markierten, proliferierenden Makrophagen zeigen eine Stabilität der magnetischen Markierung zumindest innerhalb der ersten vier Tage nach Inkubation. Trotz erheblicher Zunahme der Zellzahl, d.h. nach mehreren Zellteilungen, bleibt die T2-Zeit der gesamten Zellpopulation konstant. Die intrazellulär aufgenommenen Eisenoxidnanopartikel scheinen bei der Zellteilung auf die Tochterzellen weitergegeben zu werden. Eine Evaluierung längerer Zeiträume war aufgrund der hohen Teilungsrate nicht möglich, die Applikation von Mitosehemmern wie Mitomycin C wurde aufgrund unklarer Auswirkungen auf die zelluläre Viabilität verworfen.

Eine Coinkubation der VSOP mit dem Lipofektionsreagenz FuGENE zeigte zunächst eindrucksvolle Ergebnisse, sowohl hinsichtlich der Reduktion der T2-Zeit als auch hinsichtlich der absoluten Eisenmenge, quantifiziert mittels AAS. Lichtmikroskopisch zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede in der Aufnahmecharakteristik. Die Inkubation mit VSOP allein führte zu einer homogenen Inkorporation durch die gesamte Zellpopulation, im Falle der Coinkubation mit FuGENE zeigte sich eine äußerst heterogene Aufnahme. Darüber hinaus stellte sich eine Vielzahl von Liposomen adhärent an der äußeren Zellmembran dar. Insofern ist stark zu bezweifeln, dass die hohen Messwerte der Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) im Falle der mittels FuGENE-VSOP inkubierten Stammzellen tatsächlich die Menge an intrazellulär aufgenommenen Eisenoxidpartikeln widerspiegeln. Im Zusammenhang mit den ungewissen Auswirkungen nicht-inkorporierter Liposomen auf den Wirtsorganismus musste eine Verwendung der Lipofektion für die folgenden Transplantationsstudien abgelehnt werden.

Die Messung der T2-Zeit mittels MNR-Relaxometrie stellt eine einfache, reliable Methode dar, die Menge an aufgenommenen Eisenoxidnanopartikeln durch ihren mittelbaren Einfluss auf die transversale Relaxationszeit (T2-Zeit) zu bestimmen. Die T2-Relaxationszeit einer Suspension aus magnetisch markierten Zellen weist nicht nur eine inverse exponentielle Proportionalität zur Menge an zellulär aufgenommenem Eisen auf, sondern erlaubt darüber hinaus Aussagen, die mit der direkten Messung

der Eisenmenge mittels AAS nicht möglich sind. So ergeben sich bei gleicher aufgenommenener Eisenmenge je nach Zelltyp unterschiedliche T2-Zeiten. Ob die bestimmenden Faktoren dieser Zellspezifität eher in der unterschiedliche Größe der Zellen oder in einer verschiedenartigen intrazellulären Kompartimentierung begründet sind, lässt sich aufgrund der vorliegenden Daten nicht sicher feststellen, jedoch erscheinen gänzlich verschiedene Aufnahmemechanismen unwahrscheinlich.

Mittels confokaler Laser Scanning Mikroskopie sollte die intrazelluläre Kompartimentierung der fluoreszenzmarkierten Eisenoxidnanopartikel nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Partikel nicht mit den Zellen assoziieren, sondern vielmehr eine intrazelluläre Aufnahme der Partikel in Vesikeln vorliegt, frühere Untersuchungen legen nahe, dass es sich dabei um Lysosomen handelt [59]. Durch die Kompartimentierung kommt es zu einer Bildung von räumlich separierten Aggregaten von Eisenoxidnanopartikeln. In der erzwungenen Aggregation der Eisenoxidnanopartikel begründet sich auch die Abhängigkeit der T2-Relaxationszeit von der Vitalität der magnetisch markierten Zellen. Die Reduktion der T2 Zeit nach Lyse der Zellen lässt sich mit der Freisetzung der in den Lysosomen räumlich aggregierten Eisenoxidnanopartikeln erklären. Die kompartimentierten Partikel sind von den Wasserprotonen abgeschirmt, die Desaggregation bewirkt eine größere Oberfläche und eine größeren Hydrathülle, es kommt somit zu einer Wechselwirkung mit einer größeren Anzahl Protonen. Die kernspintomographischen Untersuchungen an Zellphantomen zeigen die Möglichkeit der Akquisition hochauflösender quantitativer T2-Karten mithilfe von T2-gewichteten Multiechosequenzen. Die Übertragung auf Transplantationsstudien sollte eine nicht-invasive Darstellung der Überlebensrate erlauben. Jedoch konnte *in vivo* keine ausreichende Ortsauflösung und Signalintensität erreicht werden, um quantitative Vergleiche zu erlauben. Es zeigte sich zwar eine Abnahme der T2-Zeiten im Verlauf der Studie, unter der Berücksichtigung der Vielzahl von hinsichtlich ihres Einflusses auf die T2-Zeit gegensätzliche Effekte, wie Abwanderung der Zellen, Lyse der Zellen, Mikroblutungen etc, ist eine Abschätzung der Überlebensrate mit den derzeitigen Sequenzen jedoch nicht möglich. Es bleibt der Entwicklung signalstärkerer Sequenzen vorbehalten, eine nicht-invasive Vitalitätsdetektion zu ermöglichen.

Nach der Untersuchung der magnetischen Markierbarkeit wurden die Auswirkungen dieser Markierung auf zelluläre Viabilität und Proliferation untersucht. Bei embryonalen Stammzellen konnte keine signifikante Beeinflussung der zellulären

Viabilität nach Inkubation mit VSOP-Konzentrationen von 1,5 mM für 90 Minuten festgestellt werden, die für eine höchst effektive magnetische Markierung ausreicht. Jedoch scheinen embryonale Stammzellen von allen bisher untersuchten Zellpopulationen am empfindlichsten auf eine Inkubation mit Eisenoxidnanopartikeln zu reagieren. Längere Inkubationszeiten von 4 bzw. 24 h sind vor diesem Hintergrund trotz erhöhter Eisenaufnahme abzulehnen. Primärzellen zeigen ebenso wie Makrophagen bis zu einer VSOP-Konzentration von 12 mM keine Beeinflussung der zellulären Viabilität und Proliferation. Die Untersuchungen machen jedoch deutlich, dass es unbedingt erforderlich ist, für jede Zellpopulation die optimale Inkubationskonzentration hinsichtlich Markierungseffizienz und zellulärer Vitalität zu bestimmen.

Um Auswirkungen der magnetischen Markierung auf die Biologie der Zelle besser zu verstehen und eine Schädigung der Zelle auszuschließen, die ggf. erst bei einer weiteren Belastung der Zelle, z.B. nach Transplantation in das Wirtsgewebe, zum Zelltod führen, wurde erstmals der Grad der zellulären oxidativen Belastung nach Inkubation mit VSOP bestimmt. Es zeigte sich nach Inkubation mit den Eisenoxidnanopartikeln VSOP ein signifikanter Anstieg sowohl der Konzentration von Malondialdehyd (MDA) als auch von Proteincarbonylen. Jedoch scheint nur die hohe VSOP-Konzentration während der Inkubation die Zelle oxidativ zu belasten. Die Messung der MDA-Konzentration 24 h nach Inkubation zeigte eine Reduktion auf Kontrollwerte. Durch die Inkorporation der Partikel in Membranvesikeln scheint das Zytosol von den Eisenoxidnanopartikeln abgeschirmt zu sein. Ein negativer Einfluss von durch die Lyse im Empfängergerewebe freigesetztem VSOP auf benachbarte Zellen ist somit nicht wahrscheinlich, die effektive lokale Konzentration bewegt sich um mehrere Größenordnungen unter der Inkubationskonzentration. Da die Zugabe von Antioxidantien den transienten Anstieg der oxidativen Belastung nahezu vollständig aufhebt, sollte die Zugabe dieser Substanzen bei besonders empfindlichen Zellen erwogen werden.

Die Quantifizierung undifferenzierter unmarkierter bzw. markierter embryonaler Stammzellen mit Hilfe des Stammzellantigens SSEA zeigt keine ungewollte Induktion der Differenzierung durch VSOP. Auch bei der Differenzierung embryonaler Stammzellen zu neuronalen Vorläuferzellen nach anerkannten Protokollen [35] zeigten sich keine Unterschiede zwischen markierten und unmarkierten Zellen. Eine Beeinflussung anderer Differenzierungswege durch Eisenoxidnanopartikel kann

jedoch nicht ausgeschlossen werden, da diese sich hinsichtlich des Differenzierungsmechanismus fundamental unterscheiden.

7.2 Kernspintomographische Visualisierung magnetisch markierter Zellen

Der zweite Schritt nach der Entwicklung eines sowohl effektiven als auch die Biologie der Zelle nicht signifikant beeinflussenden magnetischen Markierungsprotokolles ist die Exploration der Grenzen und Möglichkeiten der zellulären kernspintomographischen Visualisierbarkeit. Die *in vitro* Untersuchungen an Gelphantomen zeigen, dass eine Visualisierung von 10 oder weniger magnetisch markierten embryonalen Stammzellen mittels T2*-gewichteten Sequenzen bei 17,6 T möglich ist. Es kommt zu zellulären Signalauslöschungen, die sowohl von der Gelmatrix als auch von unmarkierten Zellen sicher abgrenzbar sind.

Nach intrastriataler Injektion führen 1000 magnetisch markierte embryonale Stammzellen zu deutlichen Signalauslöschungen am Ort der Transplantation sowie im Injektionskanal. Die Injektion von unmarkierten Zellen führt zu keinen vergleichbaren Signalauslöschungen. In zwei Kontrolltieren konnten jedoch starke homogene Signalauslöschungen im oberen Teil des Injektionskanals beobachtet werden, histologisch konnten diese Signalauslöschungen Mikroblutungen zugeordnet werden.

Die Größe der hypointensen Areale stellte sich nach der Transplantation von 100 markierten Zellen wesentlich kleiner dar, dennoch war eine deutliche Abgrenzung zum Hirnparenchym gegeben. Auch eine Injektion von nur 20 markierten Zellen führte zu Signalauslöschungen im unteren Teil des Injektionskanals. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Liquor, z.B. durchmischt mit Hämosiderophagen oder Mikroblutungen Ursachen der Signalauslöschungen waren. Die histologische Quantifizierung und Phänotypisierung zeigte: **i)** die Signalthypointensitäten werden von eisenoxidmarkierten Stammzellen verursacht, es finden sich keine weiteren Eisen-positiven Zellen (von den zwei Tieren mit Mikroblutungen abgesehen); **ii)** die injizierte Zellzahl wurde eher überschätzt, somit ist das kernspintomographische Detektionslimit bei 17,6 T bei unter 100 Zellen anzusetzen; **iii)** es konnte keine sekundären Phagozytose der eisenoxidmarkierten Stammzellen durch Makrophagen des Empfängerorgans beobachtet werden, die Spezifität der magnetischen Markierung scheint gewahrt zu bleiben.

Das Detektionslimit magnetisch markierter Zellen stellte sich als exponentiell von der magnetischen Feldstärke abhängig heraus. Bei einer Feldstärke von 7 T konnten noch 300 Zellen sicher nachgewiesen werden, bei einer Feldstärke von 1,5 T noch 1000 Zellen. Jedoch zeigen die Untersuchungen, dass auch bei klinischen Feldstärken die Detektion von immer noch geringen Zellzahlen möglich ist.

7.3 Zelluläre Magnetresonanztomographie an Kleintiermodellen des

Morbus Parkinson sowie der cerebralen Ischämie

Nun schienen die Voraussetzungen gegeben, mittels der Methodik der zellulären Magnetresonanztomographie auch biologisch relevante Fragestellungen der regenerativen Medizin zu beantworten. Zunächst wurden die nichtinvasive Visualisierung von eisenoxidmarkierten embryonalen Stammzellen in einem Rattenmodell des Morbus Parkinson untersucht. Nach intrastriater Injektion von 1×10^5 magnetisch markierten Zellen fanden sich ausgedehnte hypointense Signalauslöschungen im Bereich des Stichkanals. Eine Veränderung der räumlichen Verteilung dieser Hypointensitäten im Laufe der Studiendauer von 6 Monaten, die auf eine Migration der transplantierten Zellen hindeuten würden, stellte sich nicht dar. Eine Migration konnte jedoch in diesem Krankheitsmodell nicht notwendigerweise erwartet werden, da die exogenen Zellen direkt an den Ort der Läsion transplantiert wurden. Darüber hinaus handelte es sich nicht um eine akute Läsion, sondern um einen mittels 6-OHDA induzierten neurodegenerativen Prozess, der zum Zeitpunkt der Läsion schon viele Wochen abgeschlossen war. Dies steht im Gegensatz zu Transplantationsstudien bei Tiermodellen der cerebralen Ischämie, in denen Migration kernspintomographisch detektiert wurde [25, 27, 60]. Interessanterweise fanden sich jedoch gravierende Unterschiede hinsichtlich der interindividuellen Verteilung der Hypointensitäten. Dies macht deutlich, dass trotz höchstmöglicher Sorgfalt bei der stereotaktischen Transplantation, kleine Variationen des Injektionsortes bzw. anatomische Variabilität signifikant unterschiedliche Verteilungen der Zellen zur Folge haben können.

In der Histologie konnten im Bereich des Stichkanals Zellen hoher Fluoreszenzintensität im Wellenlängenbereich der GFP-Emission gefunden werden. Aufgrund der Lokalisation dieser Zellen, ihrer Morphologie und der geringen Fluoreszenzintensität in anderen Bereichen des Gehirns kann davon ausgegangen werden, dass es sich dabei um die exogenen GFP-positiven Stammzellen handelt.

Darüber hinaus konnten die T2*-gewichteten Hypointensitäten in der Magnetresonanztomographie mit dem Verteilungsmuster der fluoreszenzhyperintensiven Zellen räumlich korreliert werden. Die histochemische Berliner-Blau Färbung für Eisen zeigte ebenfalls im Bereich des Stichkanals Eisen-positive Zellen. Eine Überlagerung mit den CLSM-Aufnahmen resultierte in einer Colokalisation GFP-positiver mit Eisen-positiven Zellen. Somit scheinen im Stichkanal auch nach sechs Monaten eisenoxidmarkierte exogene Zellen vorhanden zu sein. Dieser lange Zeitraum der Stabilität der magnetischen Markierung konnte bislang nicht mit den *in vitro* Stabilitätsuntersuchungen korreliert werden, dort betrug der Untersuchungszeitraum nur wenige Tage. Die Berliner-Blau Färbung erlaubt jedoch keine Quantifizierung der intrazellulären Eisenmenge. Es muss somit unklar bleiben, wie groß die in der Zelle verbliebene Eisenmenge nach sechs Monaten noch ist. Andererseits scheint sie auszureichen, auch nach sechs Monaten deutliche Signalauslöschungen in der kernspintomographischen Bildgebung zu verursachen. Andere Arbeitsgruppen konnten eisenoxidmarkierte Zellen kernspintomographisch und histologisch noch nach ca. 8 Wochen nachweisen [27], wobei eine Vergleichbarkeit schwierig ist, da es sich sowohl um andere Eisenoxidpartikel als auch um ein anderes Transplantationsmodell handelt. Eine sekundäre Phagozytose der Eisenoxidpartikel durch ortsständige Makrophagen wird in der Literatur viel diskutiert [61], hier finden sich keine Anzeichen dafür, in der Colokalisation zeigten sich nur sehr vereinzelt Zellen, die sich histochemisch Eisen-positiv und gleichzeitig GFP-negativ darstellten, jedoch konnte aufgrund der hohen Anzahl nur ein Bruchteil aller histologischen Schnitte im Bereich des Stichkanals (ca. 150 pro Tier) untersucht werden.

Die Quantifizierung der GFP-positiven Zellen im Bereich des Stichkanals in einem exemplarischen Tier zeigt eine Überlebensrate von ca. 10 % 6 Monate nach der Transplantation. Kernspintomographisch zeigte sich lediglich eine Reduktion des Volumens der hypointensen Signalveränderungen im Vergleich der Messungen in der ersten bzw. 24. Woche von ca. 40 %. Jedoch ist aufgrund des blooming effects ein linearer Zusammenhang zwischen der Zellzahl und des hypointensen Signalvolumens auch nicht zu erwarten.

In Zusammenfassung der obigen Untersuchung hat sich somit gezeigt, dass trotz dessen, dass eine Signalauslöschung in der MRT kein spezifisches Signal per se

darstellt, es dennoch bei bekannter Injektionsstelle ein über einen langen Zeitraum reliables zelluläres Signal bietet.

Im zweiten Krankheitsmodell, der cerebralen Ischämie der Maus, wurden magnetisch markierte mononukleäre Zellen *systemisch* injiziert und kernspintomographisch detektiert.

Durch hochaufgelöste T2-gewichtete Sequenzen konnte die ischämische Läsion im lebenden Gehirn der Maus mit einem hohen anatomischen Kontrast visualisiert werden. Milde Läsionen ausgelöst durch eine 30 minütige Okklusion der MCA führten zu T2-Hyperintensitäten im Striatum innerhalb der ersten 48 h, dies korreliert mit der Dynamik der Ischämieentwicklung im lateralen caudalen Putamen [62, 63].

Im Gegensatz zu einer direkten intracerebralen Injektion sind bei einer systemischen Injektion der Ort und das Ausmaß der zellulären Anreicherung unbekannt. Es ist von einer kleinen Zahl von Zellen pro Volumeneinheit auszugehen. T2*-gewichtete Bildgebung an VSOP-markierten Zellen hat den Vorteil der Ausnutzung des „blooming effect“. Dies bedeutet, dass das inhärente magnetische Moment der Eisenoxidnanopartikel zu Suszeptibilitätsänderungen führt, deren Auswirkungen weit über die Größe der magnetisch markierten Zellen hinausgehen. Dies kann am Beispiel der Hypointensitäten in der Transplantationsstudie magnetisch markierter embryonaler Stammzellen bei 17,6 T erklärt werden. Das Volumen der beobachteten Hypointensitäten nach der Injektion von 100 Zellen betrug ca. ein Kubikmillimeter, obgleich eine embryonale Stammzelle lediglich einen Durchmesser von ca. 15 µm besitzt, 100 Zellen somit lediglich ein kumulatives Volumen von ca. $1 \times 10^{-3} \text{ mm}^3$. Auf der anderen Seite führt auch Hämoglobin, sei es in intakten Gefäßen oder intraparenchymal nach Blutungen zu Signalauslöschungen. Zur Erhöhung der Spezifität der Sequenz für eisenoxid-markierte Zellen wurden relative kurze Echozeiten gewählt, zusätzlich wurde durch Gabe von reinem Sauerstoff während der kernspintomographischen Untersuchung der BOLD-Effekt, der ebenfalls zu Hypointensitäten führen kann, gemildert [64].

T2*-gewichtete Hypointensitäten traten bei 13 von 20 Mäusen ungefähr 48 h nach Injektion VSOP-markierter Vorläuferzellen auf und blieben bis zum Ende des jeweiligen Experimentes bestehen. Histologisch wurden bei allen 20 injizierten Mäusen Berliner-Blau positive Zellen gefunden, jedoch wurden Zellaggregate von 50 und mehr Zellen nur in den 13 Tieren gefunden, die auch T2*-Hypointensitäten zeigten. So konnten ab einer Zellzahl von ca. 10 Zellen pro histologischem Schnitt

alle Zellaggregate mit T2*-Hypointensitäten räumlich korreliert werden. Vergleicht man die Dicke der histologischen Schnitte von 40 µm mit der Schichtdicke der kernspintomographischen Bildgebung von 400 µm, und setzt man eine Normalverteilung Zellen in benachbarten Schichten voraus, so ergibt sich ein Detektionslimit systemisch injizierter Zellen bei 7 T von einigen hundert Zellen. Jedoch konnten nur 80 % der beobachteten T2*-Hypointensitäten zweifelsfrei mit Berliner-Blau positiven Zellen korreliert werden. Dies lässt sich mit den oben diskutierten nicht-zellulären Ursachen von T2*-Hypointensitäten erklären, in diesem Zusammenhang müssen auch die fluktuierenden Hypointensitäten in zwei Kontrolltieren gesehen werden, obgleich diese von zellulären Signalen klar abgegrenzt werden konnten.

Eine sekundäre Phagozytose konnte auch in dieser Studie nicht beobachtet werden. In der Gruppe der Tiere, denen GFP-positive VSOP markierte Zellen injiziert wurden, konnte mittels confokaler Laser Scanning Mikroskopie eine Colokalisation zwischen Berliner-Blau positiven und GFP-positiven Zellen an exemplarischen Hirnschnitten gezeigt werden.

Der Vergleich der Zeitpunkte der Injektion der magnetisch markierten mononukleären Zellen sollte Hinweise auf den Mechanismus der Anreicherung der exogenen Zellen im Bereich der Ischämie geben. Eine Injektion der mononukleären Zellen 8 h nach 30 bzw. 60 min MCAO führte sowohl zu der größten Anzahl und Intensität der T2*-Hypointensitäten als auch zu der größten Anzahl Berliner Blau positiver Zellen. Der Vergleich der Dauer der MCAO zeigt bei gleichem Zeitpunkt der Injektion der Zellen deutlich bessere Ergebnisse bei 60 minütiger Okklusion. Jedoch muss einschränkend angemerkt werden, dass die Tiere nach 60 minütiger Okklusion aufgrund der Schwere der Ischämie nur eine Woche am Leben gelassen wurden [65]. Zusammengefasst hängt das Ausmaß der Anreicherung der mononukleären Zellen sowohl vom Zeitpunkt der Injektion als auch von dem Ausmaß der ischämischen Läsion ab. Bedenkt man zusätzlich die Lokalisation der visualisierten Zellen im Randbereich/Penumbra der Ischämie, so erscheint eine aktive Migration der Zellen zur akuten Pathologie, ausgelöst durch spezifische Signale wahrscheinlich. Bei einer passiven Diffusion der Zellen durch eine ruptierte Blut-Hirn-Schranke am Ort des Infarkts wären frühe Zeitpunkte der Injektion der Zellen vorteilhaft, dies ist jedoch nicht der Fall. Darüber hinaus führte eine Injektion von freiem VSOP in einer Konzentration, die der Menge an von 1×10^6 Zellen inkorporiertem Eisen

vergleichbar ist, weder zu kernspintomographischen Signalauslösungen noch zu Berliner-Blau positiven Zellen. Dies macht eine unspezifische Diffusion von freiem VSOP, das nach einer Lyse der markierten Zellen in den Blutstrom freigesetzt wurde oder eine sekundäre Phagozytose durch Makrophagen des Empfängers unwahrscheinlich.

Es konnte somit gezeigt werden, dass eine nicht-invasive Visualisierung der aktiven Migration magnetisch markierter mononukleärer Zellen in den Bereich einer ischämischen Läsion nach systemischer Injektion möglich ist, und medizinisch relevante Informationen über die Dynamik dieser Zellmigration und den besten Zeitpunkt einer Injektion von Stammzellen zu gewinnen sind.

7.4 Ausblick

Es bleibt zusammenfassend zu bemerken, dass trotz aller Fortschritte eine zweifelsfreie Identifikation eines zellulären Signals allein durch Magnetresonanztomographie noch nicht möglich ist. Es bedarf zurzeit immer noch zusätzlicher histologischer Methoden, um die Quelle einer kernspintomographischen Signalveränderung vermutlich zellulären Ursprungs zweifelsfrei zu klären. Die Entwicklung von noch spezifischeren Sequenzen, die andere Ursachen einer Signaländerung ausschließen, ist somit von größter Wichtigkeit. Dennoch kann die zelluläre MR-Bildgebung schon jetzt, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, einen wertvollen Beitrag zum Fortschritt der zellbasierten regenerativen Medizin leisten. Gerade hinsichtlich der Schwere und hohen Inzidenz der durch Stammzelltherapie potentiell therapierbaren ZNS-Erkrankungen erscheint eine intensive Forschung auf dem Gebiet der zellulären MR-Bildgebung von hoher Relevanz.

Literaturverzeichnis

- [1] Bjorklund, L. M.; Sanchez-Pernaute, R.; Chung, S.; Andersson, T.; Chen, I. Y.; McNaught, K. S.; Brownell, A. L.; Jenkins, B. G.; Wahlestedt, C.; Kim, K. S. und Isacson, O. (2002): Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 99), Nr. 4, Seite 2344-2349. URL: PM:11782534
- [2] Isacson, O.; Bjorklund, L. M. und Schumacher, J. M. (2003): Toward full restoration of synaptic and terminal function of the dopaminergic system in Parkinson's disease by stem cells, *Ann.Neurol.* (Band 53 Suppl 3), Seite S135-S146. URL: PM:12666105
- [3] Sun, Z. H.; Lai, Y. L.; Zeng, W. W.; Zhao, D.; Ye, Z. W.; Zuo, H. C. und Xie, Z. P. (2003): Mesencephalic progenitors can improve rotational behavior and reconstruct nigrostriatal pathway in PD rats, *Acta Neurochir.Suppl* (Band 87), Seite 175-180. URL: PM:14518548
- [4] Fukunaga, A.; Uchida, K.; Hara, K.; Kuroshima, Y. und Kawase, T. (1999): Differentiation and angiogenesis of central nervous system stem cells implanted with mesenchyme into ischemic rat brain, *Cell Transplant.* (Band 8), Nr. 4, Seite 435-441. URL: PM:10478726
- [5] Fukunaga, A.; Kawase, T. und Uchida, K. (2003): Functional recovery after simultaneous transplantation with neuro-epithelial stem cells and adjacent mesenchymal tissues into infarcted rat brain, *Acta Neurochir.(Wien.)* (Band 145), Nr. 6, Seite 473-80, discussion. URL: PM:12836072
- [6] Kelly, S.; Bliss, T. M.; Shah, A. K.; Sun, G. H.; Ma, M.; Foo, W. C.; Masel, J.; Yenari, M. A.; Weissman, I. L.; Uchida, N.; Palmer, T. und Steinberg, G. K. (2004): Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 101), Nr. 32, Seite 11839-11844. URL: PM:15280535
- [7] Ben Hur, T.; Einstein, O.; Mizrachi-Kol, R.; Ben Menachem, O.; Reinhartz, E.; Karussis, D. und Abramsky, O. (2003): Transplanted multipotential neural precursor cells migrate into the inflamed white matter in response to experimental autoimmune encephalomyelitis, *Glia* (Band 41), Nr. 1, Seite 73-80. URL: PM:12465047
- [8] Bulte, J. W.; Ben Hur, T.; Miller, B. R.; Mizrachi-Kol, R.; Einstein, O.; Reinhartz, E.; Zywicke, H. A.; Douglas, T. und Frank, J. A. (2003): MR microscopy of magnetically labeled neurospheres transplanted into the Lewis EAE rat brain, *Magn Reson.Med.* (Band 50), Nr. 1, Seite 201-205. URL: PM:12815696
- [9] Pluchino, S.; Quattrini, A.; Brambilla, E.; Gritti, A.; Salani, G.; Dina, G.; Galli, R.; Del Carro, U.; Amadio, S.; Bergami, A.; Furlan, R.; Comi, G.; Vescovi, A. L. und

Martino, G. (2003): Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis, *Nature* (Band 422), Nr. 6933, Seite 688-694. URL: PM:12700753

[10] Check, E. (2003): Parkinson's transplant therapy faces setback, *Nature* (Band 424), Nr. 6952, Seite 987. URL: PM:12944933

[11] Eskandar, E. N.; Flaherty, A.; Cosgrove, G. R.; Shinobu, L. A. und Barker, F. G. (2003): Surgery for Parkinson disease in the United States, 1996 to 2000: practice patterns, short-term outcomes, and hospital charges in a nationwide sample, *J.Neurosurg.* (Band 99), Nr. 5, Seite 863-871. URL: PM:14609166

[12] Lindvall, O.; Sawle, G.; Widner, H.; Rothwell, J. C.; Bjorklund, A.; Brooks, D.; Brundin, P.; Frackowiak, R.; Marsden, C. D.; Odin, P. und . (1994): Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease, *Ann.Neurol.* (Band 35), Nr. 2, Seite 172-180. URL: PM:8109898

[13] Arbab, A. S.; Bashaw, L. A.; Miller, B. R.; Jordan, E. K.; Bulte, J. W. und Frank, J. A. (2003): Intracytoplasmic tagging of cells with ferumoxides and transfection agent for cellular magnetic resonance imaging after cell transplantation: methods and techniques, *Transplantation* (Band 76), Nr. 7, Seite 1123-1130. URL: PM:14557764

[14] Bowen, C. V.; Zhang, X.; Saab, G.; Gareau, P. J. und Rutt, B. K. (2002): Application of the static dephasing regime theory to superparamagnetic iron-oxide loaded cells, *Magn Reson.Med.* (Band 48), Nr. 1, Seite 52-61. URL: PM:12111931

[15] Hinds, K. A.; Hill, J. M.; Shapiro, E. M.; Laukkanen, M. O.; Silva, A. C.; Combs, C. A.; Varney, T. R.; Balaban, R. S.; Koretsky, A. P. und Dunbar, C. E. (2003): Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells, *Blood* (Band 102), Nr. 3, Seite 867-872. URL: PM:12676779

[16] Renshaw, P. F.; Owen, C. S.; McLaughlin, A. C.; Frey, T. G. und Leigh, J. S., Jr. (1986): Ferromagnetic contrast agents: a new approach, *Magn Reson.Med.* (Band 3), Nr. 2, Seite 217-225. URL: PM:3713487

[17] Brooks, R. A.; Moiny, F. und Gillis, P. (2001): On T2-shortening by weakly magnetized particles: the chemical exchange model, *Magn Reson.Med.* (Band 45), Nr. 6, Seite 1014-1020. URL: PM:11378879

[18] Gillis, P.; Moiny, F. und Brooks, R. A. (2002): On T(2)-shortening by strongly magnetized spheres: a partial refocusing model, *Magn Reson.Med.* (Band 47), Nr. 2, Seite 257-263. URL: PM:11810668

[19] Taupitz, M.; Schmitz, S. und Hamm, B. (2003): [Superparamagnetic iron oxide particles: current state and future development], *Rofo* (Band 175), Nr. 6, Seite 752-765. URL: PM:12811686

- [20] Moore, A.; Weissleder, R. und Bogdanov, A., Jr. (1997): Uptake of dextran-coated monocrySTALLine iron oxides in tumor cells and macrophages, *J.Magn Reson.Imaging* (Band 7), Nr. 6, Seite 1140-1145. URL: PM:9400860
- [21] Taupitz, M.; Schnorr, J.; Abramjuk, C.; Wagner, S.; Pilgrim, H.; Hunigen, H. und Hamm, B. (2000): New generation of monomer-stabilized very small superparamagnetic iron oxide particles (VSOP) as contrast medium for MR angiography: pre-clinical results in rats and rabbits, *J.Magn Reson.Imaging* (Band 12), Nr. 6, Seite 905-911. URL: PM:11105029
- [22] de Laquintane, B. D.; Dousset, V.; Solanilla, A.; Petry, K. G. und Ripoché, J. (2002): Iron particle labeling of haematopoietic progenitor cells: an in vitro study, *Bio-sci.Rep.* (Band 22), Nr. 5-6, Seite 549-554. URL: PM:12635852
- [23] Bulte, J. W.; Zhang, S.; van Gelderen, P.; Herynek, V.; Jordan, E. K.; Duncan, I. D. und Frank, J. A. (1999): Neurotransplantation of magnetically labeled oligodendrocyte progenitors: magnetic resonance tracking of cell migration and myelination, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 96), Nr. 26, Seite 15256-15261. URL: PM:10611372
- [24] Fleige, G.; Nolte, C.; Synowitz, M.; Seeberger, F.; Kettenmann, H. und Zimmer, C. (2001): Magnetic labeling of activated microglia in experimental gliomas, *Neoplasia*. (Band 3), Nr. 6, Seite 489-499. URL: PM:11774031
- [25] Hoehn, M.; Kustermann, E.; Blunk, J.; Wiedermann, D.; Trapp, T.; Wecker, S.; Focking, M.; Arnold, H.; Hescheler, J.; Fleischmann, B. K.; Schwindt, W. und Buhle, C. (2002): Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 99), Nr. 25, Seite 16267-16272. URL: PM:12444255
- [26] Weissleder, R.; Moore, A.; Mahmood, U.; Bhorade, R.; Benveniste, H.; Chiocca, E. A. und Basilion, J. P. (2000): In vivo magnetic resonance imaging of transgene expression, *Nat Med* (Band 6), Nr. 3, Seite 351-355. URL: PM:10700241
- [27] Jendelova, P.; Herynek, V.; DeCroos, J.; Glogarova, K.; Andersson, B.; Hajek, M. und Sykova, E. (2003): Imaging the fate of implanted bone marrow stromal cells labeled with superparamagnetic nanoparticles, *Magn Reson.Med.* (Band 50), Nr. 4, Seite 767-776. URL: PM:14523963
- [28] Zhang, Z. G.; Jiang, Q.; Zhang, R.; Zhang, L.; Wang, L.; Zhang, L.; Arniégo, P.; Ho, K. L. und Chopp, M. (2003): Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat, *Ann.Neurol.* (Band 53), Nr. 2, Seite 259-263. URL: PM:12557295
- [29] von, Campenhausen S.; Bornschein, B.; Wick, R.; Botzel, K.; Sampaio, C.; Poewe, W.; Oertel, W.; Siebert, U.; Berger, K. und Dodel, R. (2005): Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe, *Eur.Neuropsychopharmacol.* (Band 15), Nr. 4, Seite 473-490. URL: PM:15963700
- [30] Lindvall, O. und Hagell, P. (2001): Cell therapy and transplantation in Parkinson's disease, *Clin.Chem.Lab Med.* (Band 39), Nr. 4, Seite 356-361. URL: PM:11388662

- [31] Levy, Y. S.; Stroomza, M.; Melamed, E. und Offen, D. (2004): Embryonic and adult stem cells as a source for cell therapy in Parkinson's disease, *J.Mol.Neurosci.* (Band 24), Nr. 3, Seite 353-386. URL: PM:15655260
- [32] Carvey, P. M.; Ling, Z. D.; Sortwell, C. E.; Pitzer, M. R.; McGuire, S. O.; Storch, A. und Collier, T. J. (2001): A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease, *Exp.Neurol.* (Band 171), Nr. 1, Seite 98-108. URL: PM:11520124
- [33] Riaz, S. S.; Jauniaux, E.; Stern, G. M. und Bradford, H. F. (2002): The controlled conversion of human neural progenitor cells derived from foetal ventral mesencephalon into dopaminergic neurons in vitro, *Brain Res.Dev.Brain Res.* (Band 136), Nr. 1, Seite 27-34. URL: PM:12036514
- [34] Gerlach, M.; Braak, H.; Hartmann, A.; Jost, W. H.; Odin, P.; Priller, J. und Schwarz, J. (2002): Current state of stem cell research for the treatment of Parkinson's disease, *J.Neurol.* (Band 249 Suppl 3), Seite III/33-III/35. URL: PM:12522570
- [35] Lee, S. H.; Lumelsky, N.; Studer, L.; Auerbach, J. M. und McKay, R. D. (2000): Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells, *Nat.Biotechnol.* (Band 18), Nr. 6, Seite 675-679. URL: PM:10835609
- [36] Correia, A. S.; Anisimov, S. V.; Li, J. Y. und Brundin, P. (2005): Stem cell-based therapy for Parkinson's disease, *Ann.Med.* (Band 37), Nr. 7, Seite 487-498. URL: PM:16278162
- [37] Fujikawa, T.; Oh, S. H.; Pi, L.; Hatch, H. M.; Shupe, T. und Petersen, B. E. (2005): Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells, *Am.J.Pathol.* (Band 166), Nr. 6, Seite 1781-1791. URL: PM:15920163
- [38] Erdo, F.; Buhle, C.; Blunk, J.; Hoehn, M.; Xia, Y.; Fleischmann, B.; Focking, M.; Kustermann, E.; Kolossov, E.; Hescheler, J.; Hossmann, K. A. und Trapp, T. (2003): Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke, *J.Cereb.Blood Flow Metab* (Band 23), Nr. 7, Seite 780-785. URL: PM:12843782
- [39] Sanchez-Pernaute, R.; Studer, L.; Ferrari, D.; Perrier, A.; Lee, H.; Vinuela, A. und Isacson, O. (2005): Long-term survival of dopamine neurons derived from parthenogenetic primate embryonic stem cells (cyno-1) after transplantation, *Stem Cells* (Band 23), Nr. 7, Seite 914-922. URL: PM:15941857
- [40] Lu, D.; Li, Y.; Wang, L.; Chen, J.; Mahmood, A. und Chopp, M. (2001): Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury, *J.Neurotrauma* (Band 18), Nr. 8, Seite 813-819. URL: PM:11526987
- [41] Lu, D.; Mahmood, A.; Wang, L.; Li, Y.; Lu, M. und Chopp, M. (2001): Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury

migrate into brain and improve neurological outcome, *Neuroreport* (Band 12), Nr. 3, Seite 559-563. URL: PM:11234763

[42] Munoz, J. R.; Stoutenger, B. R.; Robinson, A. P.; Spees, J. L. und Prockop, D. J. (2005): Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 102), Nr. 50, Seite 18171-18176. URL: PM:16330757

[43] Iwase, T.; Nagaya, N.; Fujii, T.; Itoh, T.; Murakami, S.; Matsumoto, T.; Kangawa, K. und Kitamura, S. (2005): Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia, *Cardio-vasc.Res.* (Band 66), Nr. 3, Seite 543-551. URL: PM:15914119

[44] Werner, N.; Junk, S.; Laufs, U.; Link, A.; Walenta, K.; Bohm, M. und Nickenig, G. (2003): Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury, *Circ.Res.* (Band 93), Nr. 2, Seite e17-e24. URL: PM:12829619

[45] Perry, G.; Sayre, L. M.; Atwood, C. S.; Castellani, R. J.; Cash, A. D.; Rotkamp, C. A. und Smith, M. A. (2002): The role of iron and copper in the aetiology of neurodegenerative disorders: therapeutic implications, *CNS.Drugs* (Band 16), Nr. 5, Seite 339-352. URL: PM:11994023

[46] Jenner, P. (2003): Oxidative stress in Parkinson's disease, *Ann.Neurol.* (Band 53 Suppl 3), Seite S26-S36. URL: PM:12666096

[47] Friedman, A. und Galazka-Friedman, J. (2001): The current state of free radicals in Parkinson's disease. Nigral iron as a trigger of oxidative stress, *Adv.Neurol.* (Band 86), Seite 137-142. URL: PM:11553971

[48] Skotland, T.; Sontum, P. C. und Oulie, I. (2002): In vitro stability analyses as a model for metabolism of ferromagnetic particles (Clariscan), a contrast agent for magnetic resonance imaging, *J.Pharm.Biomed.Anal.* (Band 28), Nr. 2, Seite 323-329. URL: PM:11929675

[49] Foster-Gareau, P.; Heyn, C.; Alejski, A. und Rutt, B. K. (2003): Imaging single mammalian cells with a 1.5 T clinical MRI scanner, *Magn Reson.Med.* (Band 49), Nr. 5, Seite 968-971. URL: PM:12704781

[50] Okabe, M.; Ikawa, M.; Kominami, K.; Nakanishi, T. und Nishimune, Y. (1997): 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells, *FEBS Lett.* (Band 407), Nr. 3, Seite 313-319. URL: PM:9175875

[51] Fleige, G.; Seeberger, F.; Laux, D.; Kresse, M.; Taupitz, M.; Pilgrimm, H. und Zimmer, C. (2002): In vitro characterization of two different ultrasmall iron oxide particles for magnetic resonance cell tracking, *Invest Radiol.* (Band 37), Nr. 9, Seite 482-488. URL: PM:12218443

- [52] Wong, S. H.; Knight, J. A.; Hopfer, S. M.; Zaharia, O.; Leach, C. N., Jr. und Sunderman, F. W., Jr. (1987): Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct, Clin.Chem. (Band 33), Nr. 2 Pt 1, Seite 214-220. URL: PM:3802504
- [53] Frank, J. A.; Miller, B. R.; Arbab, A. S.; Zywicke, H. A.; Jordan, E. K.; Lewis, B. K.; Bryant, L. H., Jr. und Bulte, J. W. (2003): Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining superparamagnetic iron oxides and transfection agents, Radiology (Band 228), Nr. 2, Seite 480-487. URL: PM:12819345
- [54] Lewin, M.; Carlesso, N.; Tung, C. H.; Tang, X. W.; Cory, D.; Scadden, D. T. und Weissleder, R. (2000): Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells, Nat Biotechnol. (Band 18), Nr. 4, Seite 410-414. URL: PM:10748521
- [55] Kalish, H.; Arbab, A. S.; Miller, B. R.; Lewis, B. K.; Zywicke, H. A.; Bulte, J. W.; Bryant, L. H., Jr. und Frank, J. A. (2003): Combination of transfection agents and magnetic resonance contrast agents for cellular imaging: relationship between relaxivities, electrostatic forces, and chemical composition, Magn Reson.Med. (Band 50), Nr. 2, Seite 275-282. URL: PM:12876703
- [56] Shapiro, E. M.; Skrtic, S. und Koretsky, A. P. (2005): Sizing it up: cellular MRI using micron-sized iron oxide particles, Magn Reson.Med. (Band 53), Nr. 2, Seite 329-338. URL: PM:15678543
- [57] Arbab, A. S.; Bashaw, L. A.; Miller, B. R.; Jordan, E. K.; Lewis, B. K.; Kalish, H. und Frank, J. A. (2003): Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging, Radiology (Band 229), Nr. 3, Seite 838-846. URL: PM:14657318
- [58] Sun, R.; Dittrich, J.; Le-Huu, M.; Mueller, M. M.; Bedke, J.; Kartenbeck, J.; Lehmann, W. D.; Krueger, R.; Bock, M.; Huss, R.; Seliger, C.; Grone, H. J.; Misselwitz, B.; Semmler, W. und Kiessling, F. (2005): Physical and biological characterization of superparamagnetic iron oxide- and ultrasmall superparamagnetic iron oxide-labeled cells: a comparison, Invest Radiol. (Band 40), Nr. 8, Seite 504-513. URL: PM:16024988
- [59] Zimmer, C.; Weissleder, R.; Poss, K.; Bogdanova, A.; Wright, S. C., Jr. und Enochs, W. S. (1995): MR imaging of phagocytosis in experimental gliomas, Radiology (Band 197), Nr. 2, Seite 533-538. URL: PM:7480707
- [60] Modo, M.; Mellodew, K.; Cash, D.; Fraser, S. E.; Meade, T. J.; Price, J. und Williams, S. C. (2004): Mapping transplanted stem cell migration after a stroke: a serial, in vivo magnetic resonance imaging study, Neuroimage. (Band 21), Nr. 1, Seite 311-317. URL: PM:14741669
- [61] Schroeter, M.; Saleh, A.; Wiedermann, D.; Hoehn, M. und Jander, S. (2004): Histochemical detection of ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO) contrast

medium uptake in experimental brain ischemia, Magn Reson.Med. (Band 52), Nr. 2, Seite 403-406. URL: PM:15282824

[62] Katchanov, J.; Waeber, C.; Gertz, K.; Gietz, A.; Winter, B.; Bruck, W.; Dirnagl, U.; Veh, R. W. und Endres, M. (2003): Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse, Brain Pathol. (Band 13), Nr. 4, Seite 452-464. URL: PM:14655751

[63] Endres, M.; Namura, S.; Shimizu-Sasamata, M.; Waeber, C.; Zhang, L.; Gomez-Isla, T.; Hyman, B. T. und Moskowitz, M. A. (1998): Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family, J.Cereb.Blood Flow Metab (Band 18), Nr. 3, Seite 238-247. URL: PM:9498840

[64] Himmelreich, U.; Weber, R.; Ramos-Cabrera, P.; Wegener, S.; Kandal, K.; Shapiro, E. M.; Koretsky, A. P. und Hoehn, M. (2005): Improved stem cell MR detectability in animal models by modification of the inhalation gas, Mol.Imaging (Band 4), Nr. 2, Seite 104-109. URL: PM:16105508

[65] Prass, K.; Meisel, C.; Hoflich, C.; Braun, J.; Halle, E.; Wolf, T.; Ruscher, K.; Victorov, I. V.; Priller, J.; Dirnagl, U.; Volk, H. D. und Meisel, A. (2003): Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation, J.Exp.Med. (Band 198), Nr. 5, Seite 725-736. URL: PM:12939340

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie, engl. atomic absorption spectroscopy
BMC	Knochenmark-Zelle, engl. bone-marrow cell
CBF	Zerebraler Blutfluss, engl. cerebral blood flow
CLSM	Confokale Laser-Scanning-Mikroskopie, engl. confocal laser scanning microscopy
DMEM	Dublecco's Modified Eagle's Medium
EB	Embryoidkörper, engl. Embryoid Body
ESC	embryonale Stammzelle, engl. embryonic stem cell
FA	Anregungswinkel, engl. flip angle
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer, engl. Fluorescence Activted Cell Sorter
FCS	fötales Kälberserum, engl. Fetal Calf Serum
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein, engl. green fluorescent protein
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie, engl. High-Performance-Liquid-Chromatography
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MCA	Arterie cerebri media
MDA	Malondialdehyd
MION	Monocrystalline iron oxide nanoparticles
MNC	Mononukleäre Zelle, engl. Mononuclear cell
MRT	Magnetresonanztomographie, engl. magnetic resonance imaging (MRI)
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie, engl. nuklear magnetic resonance
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PBN	alpha-Phenyl-N-Tert-Butyl-Nitron
PI	Propidium Jodid, engl. Propidium Iodid
RF-Puls	Anregungspuls, engl. radio frequency-pulse
ROI	Definierte Region im kernspintomographischen Bild, engl. region of interest
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Medium nach dem

	Entwicklungsort benannt)	
SAR	Spezifische Absorptionsrate	
SNR	Signal-zu-Rausch Verhältnis, engl. signal-to-noise-ratio	
SPIO	Superparamagnetischer Eisenoxidpartikel, Superparamagnetic Iron Oxide Particles	engl.
SSEA	Surface-specific-embryonic-antigen	
TBE - Puffer	Tris-Borate-EDTA - Puffer	
TE	Echozeit, engl. time of echo	
TR	Repetitionszeit, engl. time of repetition	
UCB	Nabelschnurblutzelle, engl. umbilical cord blood cell	
UPM	Umdrehungen pro Minute	
USPIO	Ultra Small Superparamagnetic Iron Oxide Particles	
VSOP	Very Small Superparamagnetic Iron Oxide Particles	

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, es war ein langer Weg bis hierher. Diese Arbeit sei Euch gewidmet.

Plamena, danke für Deine Unterstützung und Deine Begleitung in den letzten drei Jahren.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Claus Zimmer für seine Unterstützung in den vergangenen beinahe vier Jahren und für sein Vertrauen, dass er von Beginn an in mich gesetzt hat. Er gab mir die Freiheit, mich wissenschaftlich zu entwickeln und dieses Projekt mit ihm zusammen zu verwirklichen. Ich danke den Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe: Katharina Sieland, Cindy Gutzeit, Katharina Hild, Franziska Marschinke und Kathrine Weir.

Tobias Jung danke ich für seine stete Hilfsbereitschaft und Kollegialität.

Herrn Prof. Hamm, Herrn PD Dr. Matthias Taupitz und Herrn Dr. Jörg Schnorr danke ich für ihre Unterstützung und insbesondere für ihrer freundliche Aufnahme vor nunmehr zwei Jahren. Herrn Dr. Jörg Schnorr und den weiteren Mitarbeitern der AG Taupitz danke ich darüber hinaus für die Hilfe bei den tierexperimentellen Studien.

Peer Lorenz danke ich für die Zusammenarbeit, insbesondere in den ersten zwei Jahren im gemeinsamen Büro und Labor.

Für die Zusammenarbeit und sein Vertrauen danke ich Herrn Prof. Matthias Endres und seiner AG.

Ich danke Dr. Cornelius Faber und Thomas Neuberger, Experimentelle Physik Lehrstuhl Prof. Haase, Universität Würzburg, für die Kooperation bei den kernspintomographischen Untersuchungen bei 17,6 T und die immer freundliche Aufnahme in Würzburg.

Susanne Mueller danke ich für die Unterstützung bei den kernspintomographischen Messungen bei 7 T und ihre stete Hilfsbereitschaft. Jens Steinbrink danke ich für die Aufnahme in den Physiker-Kreis und seine Unterstützung.

Ich danke Herrn Prof. Ulrich Dirnagl für seine Unterstützung und die konstruktiven Diskussionen.

Herrn Dr. Pilgrimm von der Firma Ferropharm danke ich für die großzügige Überlassung der Eisenoxidnanopartikel VSOP und die Durchführung der AAS-Untersuchungen.

Ich danke Herrn PD Dr. Tilman Grune und seiner AG, Institut für umweltmedizinische Forschung, Universität Düsseldorf, für die Messungen der zellulären oxidativen Belastungen.

Johannes Boltze und Prof. Emmrich, Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Leipzig, danke ich für die Zusammenarbeit bei den Untersuchungen zu den primären Stammzellen.

Herrn Prof. Schober, Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Leipzig danke ich für die histologische Aufarbeitung und Charakterisierung im Rahmen der Studie zum Detektionslimit bei 17,6 T und der Parkinson-Studie.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Albrecht Stroh, geboren am 27.5.1974 in Berlin, an Eides Statt, die vorliegende Promotionsarbeit mit dem Titel „Bildgebung von magnetisch markierten Stammzellen in experimentellen Krankheitsmodellen des ZNS mittels zellulärer Magnetresonanztomographie“ selbstständig und ohne die unzulässige Hilfe Dritter erarbeitet und verfasst zu haben. Sie stellt keine Kopie anderer Arbeiten dar, auch nicht in Teilen. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind angegeben. Dieses Promotionsverfahren stellt das erste von mir beantragte Promotionsverfahren dar. Die dem Promotionsverfahren zugrunde liegende Promotionsordnung ist mir bekannt.

Albrecht Stroh

Publikationen

Koellner G, **Stroh A**, Raszewski G, Holy A, Bzowska A. Crystal structure of calf spleen purine nucleoside phosphorylase in a complex with multisubstrate analogue inhibitor with 2,6-diaminopurine aglycone. ***Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids***. 2003 May-Aug;22(5-8):1699-702.

Stroh A, Zimmer C, Gutzeit C, Jakstadt M, Marschinke F, Jung T, Pilgrimm H, Grune T. Iron oxide particles for molecular magnetic resonance imaging cause transient oxidative stress in rat macrophages. ***Free Radic Biol Med***. 2004 Apr 15;36(8):976-84.

Bzowska, A, Koellner G, Wielgus-Kutrowska B, **Stroh A**, Raszewski G, Holy A, Steiner T, Frank J. Crystal structure of calf spleen purine nucleoside phosphorylase with two full trimers in the asymmetric unit: important implications for the mechanism of catalysis. ***J Mol Biol***. 2004 Sep 17;342(3):1015-32.

Stroh A, Faber C, Neuberger Th, Lorenz P, Sieland K, Jakob P, Webb A, Pilgrimm H, Schober R, Pohl E, Zimmer C. In vivo detection limits of magnetically labeled embryonic stem cells in the rat brain using high-field (17.6T) magnetic resonance imaging. ***Neuroimage***. 2005 Feb 1;24(3):635-45.

Hiller K-H, Faber C, Neuberger Th, Kohler S, **Stroh A**, Zimmer C, Jakob P. Magnet-Resonanz-Tomographie: Möglichkeiten der molekularen Bildgebung. ***Z. Med. Phys.*** 2005;15(3):155-62.

Zimmer, C, Faber C, **Stroh A**. Tracking of stem cells in the CNS by Molecular Magnetic Resonance Imaging (MRI). ***Rivista di Neuroradiologia*** 2005;18: 437-449

Andresen V, Bach D, Poellinger A, Tsrouya C, **Stroh A**, Foerschler A, Georgiewa P, Zimmer C, Monnikes H. Brain activation responses to subliminal or supraliminal rectal and auditory stimuli in irritable bowel syndrome. ***Neurogastroenterol Motil, Motil.*** 2005 Dec;17(6):827-37.

Andresen V, Poellinger A, Tsrouya C, Bach D, **Stroh A**, Foerschler A, Georgiewa P, Schmidtman M, van der Voort IR, Kobelt P, Zimmer C, Wiedenmann B, Klapp BF,

Monnikes H: Cerebral processing of auditory stimuli in patients with irritable bowel syndrome (IBS). **World J Gastroenterology**, *in press*.

Stroh A, Zimmer C, Werner N, Gertz K, Weir K, Kronenberg G, Steinbrink J, Mueller S, Sieland K, Dirnagl U, Nickenig G, Endres M. Tracking of systemically injected mononuclear cells in the ischemic brain by MRI. *submitted*

Preise

- Nachwuchspreis für besondere Forschungsleistungen in Medizin und Life Sciences 2003; vergeben durch die Roland-Ernst-Stiftung, Leipzig
- Kurt-Decker-Preis der Deutschen Gesellschaft für Neuroradiologie 2005

Konferenzen

- "Route 28 – Summits in Neurobiology – Stem-cell based therapeutic approaches for Parkinson´s Disease"; 22.-28. August 2002, Frauenchiemsee; Poster und Teilnahme am Workshop
- "Super-paramagnetic MR Contrast Agents for Brain Cell Labeling"; 4.-6. October 2002, Prag; Vortrag
- "The Second Annual Meeting of the Society for Molecular Imaging"; 15.-18. August 2003, San Francisco; Poster
- "International Society for Magnetic Resonance Imaging in Medicine – 12th Scientific Meeting"; 15.-21. Mai 2004, Kyoto; Poster
- "24th Congress of the European Society of Neuroradiology"; 8.-11. September 2004, Aachen; Poster und Vortrag

- "Society for Neuroscience – 34th International Meeting", 22.-27. Oktober 2004, San Diego, Vortrag
- "International Society for Magnetic Resonance Imaging in Medicine – 13th Scientific Meeting"; 7.-13. Mai 2005, Miami; Poster
- „40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft. für Neuroradiologie“; 1.-3. September 2005, Dresden; Vortrag anlässlich der Verleihung des Kurt-Decker-Preises 2005